Experimentelle Untersuchungen zur Veränderung des c-AMP Spiegels in antineoplastisch behandelten menschlichen Tumoren nach Heterotransplantation auf nu/nu Mäuse

Christa Seibel-Kreppel

Diss Frankfurt am Main
1983

UNIV.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523704_0045

Aus dem Zentrum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Abteilung für Gynäkologie und Onkologie
(Leiter Prof. Dr. H. Schmidt-Matthiesen)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERÄNDERUNG DES C-AMP SPIEGELS IN ANTINEOPLASTISCH BEHANDELTEN MENSCHLICHEN TUMOREN NACH HETEROTRANSPLANTATION AUF NU/NU MÄUSE

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Christa Seibel-Kreppel aus Hadamar/Limburg

Frankfurt am Main 1983

Dekan: Prof.Dr.med. H.J. Müller

Referent: Prof.Dr.med. G. Bastert

Koreferent: Prof. Dr. med. A. Wacker

Tag der mündlichen Prüfung: 2.11.83

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 3

1. Vorüberlegung zur Testung 3
2. Transplantation an nu/nu Mäusen 4
3. Zytostatika- und Hormontherapie 4
4. C-AMP-Bestimmung 5
   - 4.1. Prinzip der Methode
   - 4.2. Verwendete Materialien zur c-AMP-Bestimmung
   - 4.3. Vorbereitung der biologischen Proben-Gewebe
   - 4.4. Erstellung der Standardkurve
   - 4.5. Berechnung des c-AMP-Gehaltes
     - 4.5.1. Graphische Darstellung
     - 4.5.2. Beispiel einer Standardkurve
     - 4.5.3. Beispiel einer c-AMP-Berechnung

III. Gang der Untersuchung und Ergebnisse 12

1. Ovarial-Ca 12
   - 1.1. Kontrollgruppe
   - 1.2. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Adriamycin
   - 1.3. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Amethopterin
   - 1.4. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Cyclophosphamid
   - 1.5. Zusammenfassung

2. Mamma-Ca (Pat. L.) 15
   - 2.1. Kontrollgruppe
   - 2.2. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Amethopterin
   - 2.3. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Cyclophosphamid
   - 2.4. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Oestrogen

2.5. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Adriamycin
2.6. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Testosteron

3. Mamma-Ca (Pat. S.) 19
3.1. Kontrollgruppe
3.2. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Cyclophosphamid
3.3. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Testosteron
3.4. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit dem Salmon-Schema
3.5. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Amethopterin
3.6. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Adriamycin
3.7. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Oestrogen
3.8. Zusammenfassung beider Mamma-Ca

IV. Statistische Auswertung 22

1. Statistische Methode 22
2. Berechnung einseitiger Testwerte 24
2.1. Testergebnisse der Mamma-Tumore (Pat. L. und S.)
2.2. Testergebnisse des Ovarial-Ca

V. Graphische Darstellung des Wachstums der Tumore 25

Ergebnisse der Wachstumskurven 43

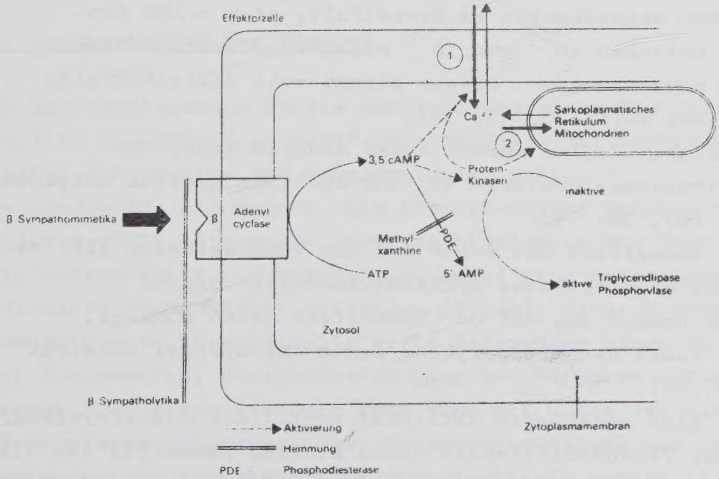
VI. Zusammenfassung 43

VII. Diskussion 44

VIII. Literaturverzeichnis 49

I. Einleitung

Im Jahre 1971 erhielt E.W. Sutherland für die Entdeckung und Identifizierung einer neuen chemischen Substanz, dem cyklischen Adenosin-3',5'-monophosphat, den Nobelpreis. Er erkannte als Erster die Bedeutung, die diese Substanz als Vermittler bei der Wirkung bestimmter Hormone besitzt (35, 49, 50). In den darauffolgenden Jahren konnte auf Grund intensiver Forschungen bewiesen werden, daß dem c-AMP die Rolle eines wichtigen biologischen Zellregulators zukommt (46). C-AMP findet sich beim Menschen in allen Körperzellen. Der intrazelluläre Gehalt schwankt jedoch je nach Aktivität und Einflußnahme des auf- und abbauenden Enzymes. Unterliegen diese Enzyme keiner Beeinflussung durch intra- oder extrazelluläre Faktoren, so liegt die Konzentration des c-AMP bei den meisten Geweben in der Größenordnung von 10^{-7}M. (Zum Vergleich: die Konzentration von ATP liegt bei 5×10^{-3}M.)
Die folgende graphische Darstellung zeigt anhand der biochemischen Wirkungsweise der ß-Sympathomimetika den Regulationsmechanismus und die Stellung des c-AMP im Zellhaushalt.



UNIV. LEIDEN BIBL.

Dabei katalysiert die Adenylcyclase, die in der Zytoplasmamembran gebunden ist, mit Hilfe von Mg^{++} die Bildung von c-AMP aus ATP durch Cyclisierung des a-ständigen Phosphates und Abspaltung von Pyrophosphat.
Der Abbau erfolgt durch die Phosphodiesterase, die das c-AMP durch hydrolytische Ringöffnung - auch hier mit Hilfe von Mg^{++} - zum 5-AMP umbaut (36).
Neben der Beteiligung des c-AMP bei der Übermittlung von Hormonwirkungen auf das Zellinnere ("second messenger Modell"), läßt es sich ferner bei einer großen Zahl von physiologischen Prozessen nachweisen.
Beispielsweise wird die Nettoproteinsynthese in der Leber durch erhöhte c-AMP-Spiegel vermindert.
Andere Untersuchungen lassen vermuten, daß der c-AMP-Spiegel einen Einfluß auf die Proliferation maligner und normaler Zellen hat (10).
Manche Untersucher konnten bei bestimmten Tumorzellen durch exogene Zufuhr von c-AMP oder Medikamenten, die den zellulären c-AMP-Spiegel anheben, die Proliferation von Tumorzellen hemmen (11, 19, 33, 38, 39, 40).
Die bisher vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß trotz starker Schwankungen im Einzelfall, eine c-AMP Konzentration zwischen 10^{-3} und 10^{-6} eine Proliferationshemmung bis zu 90% bewirken kann. Dieser Effekt soll dosisabhänging und reversibel sein (28, 33, 38).
Von den malignen Zellen wurden unter anderem HeLa, Rous Sarkoma, virustransformierte 3T3 und Ehrlichs Ascites Carcinom untersucht (27, 38, 44).
Für diesen Hemmeffekt des c-AMP auf das Tumorwachstum gibt es verschiedene hypothetische Erklärungsmodelle. Manche Untersucher nehmen an, daß der Hemmeffekt davon abhängt, in welcher Phase des Mitosezyklus der c-AMP-Spiegel einwirkt (9, 30, 52, 59).
Dabei soll eine veränderte Aktivität sowohl der Adenylcyclase als auch der Phosphodiesterase einen Einfluß haben (1, 31, 43).
Bisher wurden zumindest zwei verschiedene PDE mit unterschiedlichen K_M-Werten nachgewiesen (1, 43).
Andere Untersucher nehmen an, daß c-AMP einen Einfluß auf

die sogenannte "density inhibition of growth" hat (44, 48). Sheppard (47) vermutet, daß ein verminderter c-AMP-Spiegel zusammen mit einer veränderten zellulären Agglutinabilität eine notwendige Voraussetzung für eine maligne Transformation ist.
Die Interpretation der bisherigen Befunde ist dadurch erschwert, daß die weitaus meisten Untersuchungen unter "in vitro"Bedingungen durchgeführt wurden, und deshalb nur mit starken Einschränkungen auf "in vivo" Verhältnisse übertragbar sind.

Ausgehend von diesen Untersuchungsergebnissen sollte mit der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob auch für auf nu/nu Mäuse transplantierte Mamma- und Ovarialcarcinome eine Korrelation zwischen Tumorwachstum und c-AMP-Spiegel nachgewiesen werden kann.
Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob in dieser Hinsicht ein Unterschied zwischen antineoplastisch behandelten und unbehandelten Transplantaten besteht.

II. Material und Methoden

1. Vorüberlegung zur Testung

In der vorliegenden Studie wurde anhand eines "in vivo" Modells der Gehalt an c-AMP nach Therapie mit unterschiedlichen Zytostatika und Hormonen untersucht.
Es wurden für die Tumore, die transplantiert wurden, nu/nu Mäuse gewählt, die neben ihrer Haarlosigkeit und Thymusaplasie ein Fehlen von T-Lymphozyten und damit eine mangelhafte zelluläre Immunantwort aufweisen (21,24). Diese Transplantattumore können über beliebig viele Zellzyklen hindurch z.B. mit Zytostatika, Röntgenbestrahlung und Hormonen behandelt werden. Der Therapieerfolg kann dann mit Hilfe der Histologie, 3H-Thymidinmarkierungsindex, Chromosonenanalyse und dem Austesten der Steroidhormonmuster ermittelt werden (3).

Die Transplantation und Therapie an nu/nu Mäusen mit den Bestimmungen der jeweiligen Letalitätsdosis (LD) wurde von der Arbeitsgruppe um Professor Bastert, Universitäts-Frauenklinik in Frankfurt, geleistet.
Wir leiteten den Erfolg der Therapie aus der Veränderung der Größe der Tumorflächen, die nach der Ellipsenformel ausgerechnet wurde, ab.

2. Transplantation an nu/nu Mäusen

Die Tumore - ein Ovarialcarcinom und zwei Mammacarcinome - wurden innerhalb der ersten 30 Minuten nach Exstirpation in Äthernarkose transplantiert.
Dabei wurde das Tumorgewebe in der Größe von 5 x 8 x 8mm in der Region der vorderen Milchleiste knapp unterhalb der Schulterblattspitze subcutan eingebracht.
Wenn die Tumore in ihrem Wachstum auf nu/nu Mäusen eine durchschnittliche Größe von Ø 0,8 cm erreichten, wurde mit der Behandlung begonnen.

3. Zytostatika- und Hormontherapie

Die Testosterongruppe erhielt einmal wöchentlich 100 mg/kg Körpergewicht Testosteronpropionat und Testosteronönanthat i.m., die Östradiolgruppe 20 mg/kg KG Östradiol-17n-valerianat in wöchentlichen Abständen injiziert.
Von den Zytostatika wurde pro Woche 20% der LD 50 intraperitoneal injiziert. Zur Bestimmung der LD 50 in vivo an den Transplantaten wurde das WL-24-System nach Hackenberg und Bartling verwendet (22).
Die LD 50 Dosen der verschiedenen Zytostatika betrugen:

Cyclophosphamid	= Endoxan	487 mg/kg Maus
Adriamycin	= Adriblastin	13 mg/kg Maus
Amethopterin	= Methotrexat	100 mg/kg Maus

Salmon Behandlungsschema:
10% LD 50 von Adriamycin am 1. Tag
4% LD 50 von Cyclophamid am 2., 3., 4., 5. Tag.

Die Absterberate wurde über 28 Tage verfolgt. In 5-10 tägigen Abständen wurde der Tumor vermessen.
Aus dem jeweils größten und senkrecht darauf stehenden Durchmesser der Tumorfläche konnte nach der Ellipsenformel die Gesamtoberfläche berechnet werden.
Nach beendeter Behandlung konnte das Tumorgewebe exstirpiert und sofort in flüssigen Stickstoff überführt werden.

4. C-AMP Bestimmung

Zur Bestimmung des Gehaltes an c-AMP wurde der Radioimmunassaykit von der Firma Schwarz/Mann benutzt.

4.1. Prinzip der Methode

Dieser Test beruht auf der kompetitiven Bindung von Succinyl-c-AMP-Tyrosinmethylester (J^{125}) und dem endogenen c-AMP an eine begrenzte Anzahl von in Frage kommenden Bindungsrezeptoren auf einen Antikörper, der für c-AMP spezifisch ist.
Der Antikörper als Begrenzungsfaktor wird in der Probe mit dem zu untersuchenden Antigen und einer bekannten Menge von radioaktivem Antigen gemischt.
Während einer angemessenen Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem markierten und dem unmarkierten Antigen-Antikörperkomplex ein, da das endogene und das markierte Antigen mit den gleichen Bindungsstellen der Antikörper konkuriert.
Als Ergebnis stellt sich die Menge des gebildeten markierten Komplexes in einer umgekehrten Beziehung zu der unmarkierten Antigenkonzentration dar.
Die Antigenkonzentration der unbekannten Probe läßt sich durch Vergleich und Berechnung aus einer bekannten Standardkurve ermitteln. Der Antikörper dieses Testes wurde in Kaninchen durch Zufuhr von Succinyl-c-AMP gebildet und ist für c-AMP spezifisch. Der markierte Antikörper ist ein c-AMP-Derivat: Succinyl-c-AMP-Tyrosin-methylesther (J^{125}), (S-c-AMP-TME J^{125}).

Die Trennung dieses Antigens, das an den Antikörper gebunden ist, von dem freien Antigen, wird durch die Präzipitation des Antigen-Antikörperkomplexes mit einer Ammoniumsulfatlösung bewirkt.
Nach dem Zentrifugieren und dem Dekantieren finden sich die gebundenen Radioaktivitäten in den zurückgebliebenen festen Anteilen, und dieser markierte Antigen-Antikörperkomplex läßt sich dann in einem Szintillationszähler messen.

4.2. Verwendete Materialien zur c-AMP-Bestimmung

4.2.1. Herstellung des Natriumacetatpuffers - Reagenz I

2,05 g wasserfreies Natriumacetat wird in ca. 400 ml destilliertem Wasser gelöst und unter Zufügen von 1 n Essigsäure bis zu ph 6,2 (mit PH-Messer) eingestellt. Nach Auffüllen dieser Lösung mit dest. Wasser auf 500 ml hat man nun einen 0,05 m Natriumacetatpuffer mit dem ph = 6,2. Die Lösung muß alle 14 Tage neu angesetzt werden und ist kühl aufzubewahren.

4.2.2. Herstellung der Ammoniumsulfatlösung - Reagenz II

500 g Ammoniumsulfat wird in 500 ml dest. Wasser gelöst und in einem Schüttelgerät nach und nach je 20 g Ammoniumsulfat hinzugegeben, bis ein großer Überschuß an Ammoniumsuflatkristallen vorhanden ist (mindestens 30 Minuten lösen). Man hat nun eine gesättigte Lösung einer $(NH_4)_2SO_4$.
Für den Test werden nun 60 ml des klaren Überstandes mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt - je nach benötigter täglicher Menge.

4.2.3. Herstellung einer 6% Trichloressigsäure

Für die Vorbereitung der biologischen Proben, in diesem

Fall dem Gewebe, wird zur Homogenisierung eine 6% Trichloressigsäure benötigt.

4.2.4. Radioimmunassaykit

Der Kit enthält drei verschiedene Standardlösungen: A, B, C und Succinyl-c-AMP-TME J^{125}, c-AMP-Antiserum.
Die Lösungen können nur bis zur angegebenen Zeit benutzt werden und müssen gefroren aufbewahrt werden.

4.3. Vorbereitung der biologischen Proben - Gewebe

4.3.1. Sofort nach Exzision des Gewebes Überführung und Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -80°.

4.3.2. 2-10 mg des Gewebes werden bei -20° pulverisiert.

4.3.3. Nach Zugabe von 500 ml 6% Trichloressigsäure Homogenisierung bei 4°.

4.3.4. In einer gekühlten Zentrifuge (4°) wird für 15 Minuten bei 4000° UpM zentrifugiert und der Überstand durch vorsichtiges Pipettieren gewonnen.

4.3.5. Der Überstand wird mehrmals (2-3 mal) mit je 5 ml Äthyläther, der mit Wasser gesättigt ist, gewaschen und die überstehende Ätherphase abdekantiert.

4.3.6. Die wässrige verbliebene Lösung muß im Wasserbad bei 60-70° unter Zufuhr von Luftstrom eingetrocknet werden.

4.3.7. Der trockene Rückstand wird in 1,0 ml Acetatpuffer (= Reagenz I) gelöst.

4.3.8. Für den Radioimmunassay werden nun 25 µl-100 nl der Lösung mit Reagenz I auf 300 µl aufgefüllt und unter Schritt 4 der Vorbereitung für die Standardkurve fortgefahren.

Von dieser Anleitung mußte in Punkt 4.3.2. abgewichen werden: Die Verarbeitung von weniger als 50 mg Gewebe/Einzelprobe

war aus technischen Gründen nicht möglich.
Dementsprechend wurde die Menge der 6% Trichloressigsäure, die zur Homogenisierung gebraucht wurde, variiert.
Gewaschen wurde dann mit der doppelten Menge Äthyläther ca. 4-5 mal.
Bei der Berechnung aus der Standardkurve wurde die erhöhte Gewebemenge berücksichtigt.
Die weitere Verarbeitung erfolgt wie unter 4.3.6. angegeben.

4.4. Erstellung der Standardkurve

Um eine größere Genauigkeit in der Berechnung des c-AMP zu erreichen, wurde die Standardkurve jeweils mit den täglich neu zu ermittelnden Proben angesetzt.
Benötigt werden 24 Glasröhrchen:

Röhrchen Nr.	Reagenz I
1,2	400 µl
3, 4, 5, 6, 11, 12, 17, 18	300 µl
7, 8, 13, 14, 19, 20	250 µl
9, 10, 15, 16, 21, 22	200 µl
23, 24	---

Es wird bei Raumtemparatur gearbeitet.
Die Standardlösungen des c-AMP (A, B, C) werden wie folgt zugefügt:

Röhrchen Nr.	C-AMP-Standard/µl	C-AMP/pmol/Ansatz
5, 6	25 Standard A µl	0,025
7, 8	50 Standard A ul	0,05
9, 10	100 Standard A µl	0,10
11, 12	25 Standard B µl	0,25
13, 14	50 Standard B µl	0,50
15, 16	100 Standard B µl	1,00
17, 18	25 Standard C µl	2,50
19, 20	50 Standard C µl	5,00
21, 22	100 Standard C µl	10,00

Zu allen Röhrchen wird jetzt 100 µl S-c-AMP-TME J^{125} zugefügt und gut gemischt.

In die Röhrchen 3-22 kommt 100 µl c-AMP-Antiserum.
Alle Ansätze werden in einem Schüttelgerät gut gemischt und dann mit Folie verschlossen.
Für 18-20 Stunden wird bei 2-4° im Kühlschrank gekühlt.
Obwohl der Test schon nach einer Stunde Kühlung verwertbare Ergebnisse zeigte, erwies er sich doch erst nach längerer Inkubation ausreichend stabil.
Alle Röhrchen werden in ein Eisbad gestellt und hier weiter verarbeitet.
In die Röhrchen 1-22 werden nun jeweils 2,5 ml 60% Ammoniumsulfatlösung gegeben - Schüttelmixer! - und für weitere 10 Minuten im Eisbad belassen.
Die Röhrchen 1-22 werden in der Zentrifuge bei 2500-5000 UpM und 4° mindestens 30 Minuten lang zentrifugiert.
Anschließend kommen die Röhrchen wieder ins Eisbad. Der Überstand der Ansätze 1-22 wird dekantiert und verworfen.
Eventuell muß mit einem Wattestab die restliche Flüssigkeit abgetupft werden.
Die den Rückstand enthaltenden Ansätze 1-22 und die beiden Röhrchen 23 und 24 werden nun eine Minute in einem Szintillationszähler für feste Kristalle gezählt.

4.5. Berechnung des c-AMP-Gehaltes

Der Durchschnitt der Werte, die in den Ansätzen Nr. 1 und 2 gefunden werden, repräsentiert den Leerwert.
Dieser Leerwert muß von jedem anderen Wert der Ansätze 3-22 abgezogen werden, um die wirklichen Standardwerte zu erhalten.
Der Durchschnitt der Werte in den Ansätzen 23 und 24 ergibt - nach Abzug des Leerwertes - die totale Bindungskapazität für c-AMP.

4.5.1. Graphische Darstellung

Die Standardkurve wird auf dreidekadisches und semilogarithmisches Papier aufgetragen.
Die in % angegebene c-AMP-Bindung wird dabei gegen die in pmol angegebene c-AMP-Konzentration als logarithmische Funktion aufgetragen.

In der Standardkurve ist nun enthalten:

	Ansatz-Nr.	Reagenz I	Standard	J^{125}	Antikörper
Leerwert	1	400 µl	---	100 µl	---
	2	400 µl	---	100 µl	---
Leerwert mit Antikörper	3	300 µl	---	100 µl	100 µl
	4	300 µl	---	100 µl	100 µl
Standard A					
0,025 pmol	5	300 µl	25 µl	100 µl	100 µl
	6	300 µl	25 µl	100 µl	100 µl
0,050 pmol	7	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
	8	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
0,10 pmol	9	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl
	10	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Standard B					
0,25 pmol	11	300 µl	25 µl	100 µl	100 µl
	12	300 µl	25 µl	100 µl	100 µl
0,50 pmol	13	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
	14	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
1,0 pmol	15	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl
	16	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Standard C					
2,5 pmol	17	300 µl	25 µl	100 µl	100 µl
	18	300 µl	25 µl	100 µl	100 µl
5,0 pmol	19	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
	20	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
10,0 pmol	21	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl
	22	200 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Gesamt-	23	---	---	100 µl	---
aktivität	24	---	---	100 µl	---

Die prozentuale Bindung ergibt sich aus der Berechnung:

$$\%\text{-Bindung c-AMP} = \frac{\text{Standardmeßwert}}{\text{Meßwert d. Ansätze 23, 24}} \times 100$$

4.5.2. Beispiel einer Standardkurve

Ansatz Nr.	CPM	Korrig. CPM	Durchschnitt CPM	% Bind.	c-AMP pmol/Ansatz
1	880	---	874	---	---
2	868	---		---	---
3	4160	3286		45,7	Trace
4	4679	3805		52,9	Trace
5	4294	3420		47,5	0,025
6	4097	3223		44,8	0,025
7	3816	2942		40,9	0,05
8	4099	3225		44,9	0,05
9	3690	2816		39,2	0,10
10	2950	2076		28,9	0,10
11	2728	1854		25,4	0,25
12	2792	1919		26,7	0,25
13	2527	1653		23,0	0,50
14	2560	1686		23,4	0,50
15	1814	940		13,1	1,00
16	1949	1075		14,9	1,00
17	1648	774		10,8	2,50
18	1707	833		11,6	2,50
19	1427	553		7,7	5,00
20	1305	431		6,0	5,00
21	1299	425		5,9	10,00
22	1088	214		3,0	10,00
23	7986	7112	7192		
24	8146	7272			

4.5.3. Beispiel einer c-AMP-Berechnung

Das Gewebe wird anhand der Beschreibung aufgearbeitet und angesetzt.
Im Allgemeinen wurden folgende Verdünnungen gewählt:
1 : 2, 1 : 3, 1 : 6, 1 : 12.

Stand nicht genug Gewebe zur Verfügung, wurden nur zwei Verdünnungen ausgewählt.
Die Bindung des c-AMP wurde in Prozent ausgedrückt und mit der oben erwähnten Berechnungsformel unter Zuhilfenahme der Standardkurve errechnet. Aus der prozentualen Bindung wurde der absolute c-AMP-Gehalt in pmol/100 mg Gewebe berechnet.

III. Gang der Untersuchung und Ergebnisse

1. Ovarial-Ca

1.1. Kontrollgruppe

Aus dem Kollektiv der durchnumerierten Mäuse wurden einer Anzahl mit den Nummern 610, 630, 631, 634 und 640 in der angegebenen Weise ein Stück Gewebe eines Ovarial-Ca implantiert. Diese Gruppe blieb als Kontrollgruppe unbehandelt.
Die Tumore wurden zu dem Zeitpunkt exstirpiert, an dem auch die verschiedenen Zytostatika-Behandlungen der anderen Mäuse abgeschlossen war.
War für die c-AMP-Bestimmung genügend Gewebe vorhanden, so konnten mehrere Untersuchungen durchgeführt werden.
Obwohl die Werte der Mehrfachbestimmungen aus einem Tumor einander korrelieren - wie in der Tabelle nochmals ersichtlich - schwanken die c-AMP-Werte der verschiedenen Tumore sehr. Die Werte differieren von 2,35 pmol/100 mg Gewebe (bei Wiederholungsmessungen 2,48 - bez. 1,8 pmol/100 mg Gewebe) bei Maus 630 bis 10,60 pmol/100 mg Gewebe und 11,97 pmol/100 mg Gewebe (Wiederholungsmessung) bei Maus 640.
Dazwischen liegen die c-AMP-Werte der Tumoren, die auf den Mäusen mit der Nummer 610, 631 und 634 gefunden wurden.
Der Tumor 610 erbrachte einen c-AMP-Gehalt von 4, 11 und 4,14 pmol/100 mg Gewebe, 631 ergab bei viermaligem Messen die Werte 6,00 -, 5,8 -, 6,6 -, und 5,6 pmol/100 mg Gewebe und der Tumor 634, der sehr dicht an den Ergebnissen des Tumors 630 lag, 2,50 -, und 2,25 pmol/100 mg Gewebe.

Tabelle I

Nr. d. Mäuse:	610	630	631	634	640	
Kontrollgruppe	4,11	2,53	6,00	2,50	10,60	
= unbehandelte	4,14	2,48	5,8	2,25	11,97	- pmol/
Tumore		1,8	6,6			100 mg
C-AMP-Gehalt			5,6			Gewebe

1.2 C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Adriamycin

Die zweite Gruppe von Mäusen mit den Nummern 606, 626, 624, 611, 622, 635, wurde einer Behandlung in der vorher angegebenen Weise mit Adriamycin unterzogen.
Nach Beendigung der Therapie wurde der c-AMP-Spiegel bestimmt. Teilweise - bei den Tumoren 606, 626, 622 und 635 - mußten zwei Gewebe zusammen in einem Ansatz verarbeitet werden, da die Einzelmenge die noch mögliche Bearbeitungsgrenze unterschritten hätte.
So erreichten die Tumorwerte der Tumore 606 und 626 zusammengenommen den c-AMP-Spiegel von 2,89 -, 2,69 -, 2,79 pmol/100 mg Ausgangsgewebe (gefroren) und die Tumore mit den Nummern 622 und 635 einen Wert, der zweimal bei 4,92 pmol/100 mg Gewebe lag. Die beiden übrigen, mit Adriamycin behandelten Tumore, wiesen einen c-AMP-Spiegel von 1,26 -, 1,64 pmol/100 mg Gewebe für den Tumor Nr. 624 und 5,40 -, und 6,10 pmol/100 mg gefrorenes Ausgangsgewebe für den Tumor 611 auf.

Tabelle II

Nr. d. Mäuse:	606 626	624	611	622 635	
Nach Behandlung	2,89	1,26	5,40	4,92	- pmol/100 mg
mit Adriamycin	2,69	1,64	6,10	4,92	Gewebe
C-AMP-Gehalt	2,79				

1.3 C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Amethopterin

In dieser Gruppe wurden die Mäuse in der vorher angegebenen Weise mit Amethopterin behandelt.
Auch hier mußten in dem Kollektiv mit den Nummern 636, 615, 643, 617, 641 und 623 zwei Gewebe zusammen in einem Ansatz verarbeitet werden.
Die beiden zusammen verarbeiteten Gewebe besaßen einen c-AMP-Spiegel (Nummern 641 und 623) von 2,85 pmol/100 mg Ausgangsgewebe. Einen starken Ausreißer nach oben zeigt das Gewebe mit der Nummer 636: zweimal lag hier der c-AMP-Spiegel über 5 pmol/100 mg: 5,58 -, und 5,39 pmol/100 mg Gewebe.
Das Gewebe mit der Nummer 615 erreichte einen Spiegel von 1,50 -, 1,08 -, Nummer 643 1,09 -, und die Nummer 617 1,34 -, 1,32 -, 1,43 pmol c-AMP/100 mg gefrorenes Ausgangsgewebe.

Tabelle III

Nr. d. Mäuse:	636	615	643	617	641 623	
Nach Behandlung	5,58	1,50	1,09	1,34	2,85	- pmol/
mit Amethopterin	5,39	1,08		1,32		100 mg
C-AMP-Gehalt				1,43		Gewebe

1.4 C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Cyclophosphamid

Obwohl hier sieben verschiedenen nu/nu Mäusen Tumor in der beschriebenen Weise implantiert wurde - mit den Nummern 607, 619, 642, 628, 621, 639, 627 - mußten hier bis zu drei Gewebe für einen Ansatz gepoolt werden, da die Tumore unter der Cyclophosphamidtherapie sich stark verkleinert hatten.
So liegen hier nur drei verschiedene Doppelbestimmungen vor, die jedoch alle einen relativ niedrigen c-AMP-Spiegel aufweisen. Das Tumorgewebe mit den Nummern 607, 619 und 642 wies einen c-AMP-Spiegel von 1,87 -, und 2,00 pmol'100 mg Gewebe auf.

Die Gewebe 628 und 639 betrugen zweimal 2,77 pmol/100 mg, und die Gewebe 621 und 627 lagen in dem Bereich zwischen 1,19 - und 1,23 pmol/100 mg Gewebe.

Tabelle IV

Nr. d. Mäuse:	607 619 642	628 639	621 627	
Nach Behandlung mit Cyclophosphamid	1,87	2,77	1,19	- pmol/100 mg Gewebe
C-AMP-Gehalt	2,00	2,77	1,23	

1.5. Zusammenfassung

Insgesamt wurden 24 Gewebsproben eines Ovarial-Ca nach beschriebener Weise in nu/nu Mäuse verpflanzt. Aus dem Gesamtkollektiv aller Mäuse blieb eine Gruppe von fünf Mäusen als Kontrollgruppe unbehandelt. Sechs Mäuse erhielten eine Behandlung mit Methotrexat, sechs wurden mit Adriblastin und sieben mit Endoxan behandelt.
Die Veränderung des Wachstums der behandelten oder unbehandelten Tumore (Kontrollgruppe) wurde in Wachstumskurven festgehalten.
Da unter der zytostatischen Therapie teilweise eine starke Verminderung des Tumorgewebes eintrat, mußten in diesen Fällen Gewebsproben aus unterschiedlichen Implantationsstellen der gleichen Maus verwandt werden.

2. Mamma-Ca (Pat. L.)

2.1. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe, die die Nummern 691, 688, 685 und 682 umfaßte, lag mit ihrem c-AMP-Spiegel teils im niedrigsten, teils im höchsten in dieser Untersuchung gemessenen Bereich. Zum Teil zeigten die Gewebe, obwohl sie unbehandelt waren, ein nur geringes Wachstum, so daß teilweise nur eine Bestimmung durchgeführt werden konnte.

Stand zur Wahl, von einem Gewebe nur eine Probe bestimmen zu können, oder mehrere Gewebe zusammen in einem Ansatz, so ist nach Möglichkeit der ersten Überlegung der Vorzug gegeben worden.
Der c-AMP-Spiegel des transplantierten Mamma-Ca mit der Nummer 691 betrug 0,89 -, Nummer 688: 0,45 -, und Nummer 685: 0,76 -, und 0,60 pmol/100 mg Gewebe.
Allein in dem Gewebe von der Nummer 682 wurde ein sehr viel höherer Spiegel gemessen: 8,48 -, und 7,48 pmol/100 mg Gewebe.

Tabelle V

Nr. der Mäuse:	691	688	685	682	
Kontrollgruppe = unbehandelte Tumore, C-AMP-Gehalt	0,89	0,45	0,76 0,60	8,48 7,48	-pmol/100 mg Gewebe

2.2. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Amethopterin

In der weiteren Versuchsserie mit den verschiedenen Zytostatika wurden jeweils nur drei nu/nu Mäuse therapiert.
Auch hier schwanken die ermittelten c-AMP-Spiegel innerhalb eines Therapiekollektivs.
Während für die Nummer 692 sich ein c-AMP-Gehalt von 3,30 -, 3,35 -, ermitteln ließ, ergaben die beiden anderen Untersuchungen an der Maus 700 nur 1,81-, und an der Maus 677 nur 1,61 -, und 1,49 pmol bezogen auf 100 mg Gewebe.

Tabelle VI

Nr. der Mäuse:	692	700	677	
Nach Behandlung mit Amethopterin C-AMP-Gehalt	3,30 3,35	1,81	1,61 1,49	-pmol/100 mg Gewebe

2.3 C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Cyclophosphamid

Zur Therapie standen die Mäuse mit den Nummern 698, 686 und 667 an.
Der c-AMP-Spiegel schwankte zwischen 1,40 -, bei der Nummer 698 und 667 - hier noch ein zweiter Wert: 1,30 -, - und der Nummer 686, der 3,90 pmol/100 mg Gewebe aufwies.

Tabelle VII

Nr. d. Mäuse:	698	686	667	
Nach Behandlung mit Cyclophosphamid C-AMP-Gehalt	1,40	3,90	1,40 1,30	- pmol/100 mg Gewebe

2.4. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Oestrogen

Der c-AMP-Gehalt der Tumore, die mit Oestrogen behandelt wurde, zeigen recht gleichförmige Ergebnisse. Da hier nur drei Mäuse behandelt wurden und das Tumorgewebe wieder nur für Einzelbestimmungen reichte, ist es schwierig, solche Ergebnisse in eine statistische Bewertung miteinzubeziehen. Die Nummer 689 wies einen c-AMP-Spiegel von 2,91 -, die Nummer 676: 2,05 -, und die Nummer 680 einen von 2,62 pmol/100 mg Gewebe auf.

Tabelle VIII

Nr. d. Mäuse:	689	676	680	
Nach Behandlung mit Oestrogen C-AMP-Gehalt	2,91	2,05	2,62	- pmol/100 mg Gewebe

2.5. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Adriamycin

Hier zeigten die c-AMP-Spiegel der mit Adriamycin behandelten Tumore starke Ausreißer, die sich zwischen 6,0 -, bei der Nummer 715, und 1,85 -, beziehungsweise 2,0 pmol/100 mg Gewebe bewegten.
Im mittleren Bereich fand sich die Nummer 681 mit einem c-AMP-Gehalt von 4,82 pmol/100 mg Gewebe.

Tabelle IX

Nr. d. Mäuse:	679	715	681	
Nach Behandlung mit Adriamycin C-AMP-Gehalt	1,85 2,0	6,0	4,82	- pmol/100 mg Gewebe

2.6. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Testosteron

Auch bei den Tumoren, die mit Testosteron behandelt wurden, ließ sich infolge zu geringer Tumormasse nur bei der Nummer 668 zwei Werte ermitteln: hier lagen die c-AMP-Spiegel bei 1,45 -, und 1,87 pmol bezogen auf 100 mg Gewebe.
Die beiden anderen Tumore lagen mit ihrem c-AMP-Gehalt ziemlich dicht beieinander: Nummer 713 mit 3,30 -, und Nummer 684 mit 3,76 pmol/100 mg Gewebe.

Tabelle X

Nr. d. Mäuse:	713	684	668	
Nach Behandlung mit Testosteron	3,30	3,76	1,45 1,87	- pmol/100 mg Gewebe

3. Mamma-Ca (Pat. S.)

3.1. Kontrollgruppe = unbehandelte Tumore

Die Kontrollgruppe, die die Nummern 743, 744, 774 und 788 umfaßte, wies eine starke Streuung zwischen den Werten auf. Der c-AMP-Gehalt betrug bei der Nummer 743 den höchsten Wert dieses Kollektivs: 3,98 -, und bei der Nummer 788 den niedrigsten: 1,25. Dazwischen lagen die Werte von der Nummer 744: 2,40 -, und der Nummer 774: 1,38 pmol/100 mg Gewebe.

Tabelle XI

Nr. d. Mäuse:	743	744	774	788	
Kontrollgruppe = unbehandelte Tumoren C-AMP-Gehalt	3,98	2,40	1,38	1,25	- pmol/100 mg Gewebe

3.2 C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Cyclophosphamid

Die beiden Tumorgewebe mit der Nummer 776 und 766 mußten wieder für einen Ansatz zusammengefaßt werden und ergaben dann einen c-AMP-Spiegel von 1,9 pmol/100 mg Gewebe.
Der Gehalt der Nummer 728 betrug 2,7 pmol c-AMP/100 mg Gewebe.

Tabelle XII

Nr. d. Mäuse:	728	766 776	
Nach Behandlung mit Cyclophosphamid C-AMP-Gehalt	2,7	1,9	- pmol/100 mg Gewebe

3.3. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Testosteron

Nach der Behandlung mit Testosteron lag der C-AMP-Spiegel bei der Tumornummer 783 bei 3,60 - bzw. 2,92 pmol/100 mg Gewebe und damit genau in der Mitte. 4,50 -, und 5,00 betrug der c-AMP-Gehalt bei der Nummer 745 und 1,65- bei der Nummer 777.

Tabelle XIII

Nr. d. Mäuse:	783	777	745	
Nach Behandlung mit Testosteron C-AMP-Gehalt	3,60 2,92	1,65	4,50 5,00	-pmol/100 mg Gewebe

3.4 C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit dem Salmon-Schema

Die Behandlung mit dem Salmon-Schema ist weiter vorne ausführlich aufgeführt. Leider konnten hier nur zwei Tumore implantiert und später gemessen werden. Der Tumor mit der Nummer 792 wies einen c-AMP-Spiegel von 2,61- und der Tumor mit der Nummer 735 einen c-AMP-Spiegel von 3,45 pmol/100 mg Gewebe auf.
Die Untersuchungen konnten auch nicht weiter wiederholt werden.

Tabelle XIV

Nr. d. Mäuse:	792	735	
Nach Behandlung mit Salmon-Schema C-AMP-Gehalt	2,61	3,45	-pmol/100 mg Gewebe

3.5. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Amethopterin

Hier finden wir unter der Nummer 763 die bei den Mamma-Ca gemessenen höchsten Werte: 10,59- und 10,82 pmol bezogen auf 100 mg Gewebe. Die beiden anderen c-AMP-Spiegel lagen im Mittelbereich mit Werten von 3,89- für die Nummer 785 und 1,91- beziehungsweise 2,81 pmol/100 mg für die Nummer 764.

Tabelle XV

Nr. der Mäuse:	785	763	764	
Nach Behandlung mit Amethopterin C-AMP-Gehalt	3,89	10,59 10,82	1,91 2,81	- pmol/100 mg Gewebe

3.6. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Adriamycin

Die gewonnenen c-AMP-Spiegel lagen hier alle sehr niedrig. Bei dem Tumor mit der Nummer 748 konnten Doppelbestimmungen durchgeführt werden, die Werte lagen bei 1,10- und 1,27 mol/100 mg Gewebe. Ähnlich lag der Spiegel des Gewebes 747: 1,99- und 1,72 pmol c-AMP/100 mg Gewebe.
Der c-AMP-Gehalt der Nummer 740 war 2,10 pmol/100 mg Gewebe.

Tabelle XVI

Nr. d. Mäuse:	748	740	747	
Nach Behandlung mit Adriamycin C-AMP-Gehalt	1,10 1,27	2,10	1,99 1,72	-pmol/100 mg Gewebe

3.7. C-AMP-Gehalt nach Behandlung mit Oestrogen

Die letzte Therapie wurde mit Oestrogen vorgenommen.

Dabei betrug der c-AMP-Spiegel des Tumors mit der Nummer 750 2,91- bezichungsweise 2,74 pmol/100 mg Gewebe.
Die beiden anderen Tumorergebnisse lagen dicht beieinander: Nummer 762 wies einen Spiegel von 1,53- und 1,69-, die Nummer 781 1,55- und 1,77 pmol c-AMP/100 mg Gewebe auf.

Tabelle XVII

Nr. d. Mäuse:	750	762	781	
Nach Behandlung	2,91	1,53	1,55	- pmol/100 mg Gewebe
mit Oestrogen	2,74	1,69	1,77	
C-AMP-Gehalt				

3.8. Zusammenfassung beider Mamma-Ca

Insgesamt wurden 40 Gewebsproben von zwei verschiedenen Mamma-Ca implantiert und in der angegebenen Weise therapiert.
Die beiden Kontrollgruppen umfaßten acht Mäuse.
Sechs Mäuse wurden mit Amethopterin, sechs mit Cyclophosphamid, sechs mit Oestrogen, sechs mit Adriamycin, sechs mit Testosteron und zwei mit dem Salmon-Schema behandellt.
Hierbei wurde der Verlauf des Tumorwachstums in Wachstumskurven festgehalten.
Nach Abschluß der Therapie wurde der Tumor excidiert und der c-AMP-Spiegel bestimmt.
Die c-AMP-Werte schwanken bereits bei den Kontrollgruppen zwischen 0,45- und 8,48 pmol/100 mg Gewebe.
Schwankungen traten auch bei allen anderen Kollektiven auf, so daß die Auswertung hierdurch erschwert wurde.

IV. Statistische Auswertung

1. Statistische Methode

Die Verteilung der Beobachtungen weist darauf hin, daß keine Normalverteilung vorliegt, d.h. die Standardabweichungen um

den Mittelwert streuen sehr weit. Höhere Beobachtungswerte haben größere Abstände zu den geringeren Vorwerten als kleine Beobachtungswerte.
Deshalb sollte man statistische Tests, die eine Normalverteilung voraussetzen, nicht zur Auswertung heranziehen. Genausowenig kann man in der sonst üblichen Weise Mittelwerte bilden - zumindest keine arithmetischen.
Wählt man für die graphische Darstellung halblogarithmisches Papier, so zeigen die Werte keine optisch auffällige Abweichung von der für die Normalverteilung charakteristischen Symmetrie.
Der logarithmischen Transformation entspricht die Berechnung von geometrischen Mittelwerten, die als horizontale Striche zu denken sind.
Man wählt hier günstigerweise einen von der Voraussetzung der Normalverteilung freien Test, der die Testsituation berücksichtigt, daß mehrere Versuchsgruppen mit einer Kontrollgruppe verglichen werden. Dies ist der Multiple - one - Test nach Steel (1959).

Deutung, Berechnung und Ergebnis von Steel's Multiple - one - Test

Der Test prüft in einseitiger Richtung gegen die Kontrollgruppe, ob der c-AMP-Gehalt der Versuchsgruppe mehr als nach dem Zufall zu erwarten wäre, vermindert wurde.
Die Nullhypothese lautet:

$$H_o : U_{Kontrolle} = U_{Versuchsgruppe}$$

Die Gegenhypothese lautet:

$$H_1 = U_{Kontrolle} : U_{Versuchsgruppe}$$

wobei U den Lageparameter bezeichnet.
Die Nullhypothese kann nur dann verworfen werden, wenn die Gegenhypothese H_1 mit einer Wahrscheinlichkeit größer oder gleich $(1-\alpha)$ zutrifft. α ist die Irrtumswahrscheinlichkeit dafür, einen tatsächlich nicht vorhandenen Effekt durch die statistische Testentscheidung als vorhanden zu erklären (Testentscheidung für H_1, obwohl in Wirklichkeit H_o gelten müßte. Normalerweise wird $\alpha = 0{,}05$ gewählt. Dies wird hier beibehalten).

Beim Steel-Test handelt es sich um einen "nicht-parametrischen" oder "verteilungsfreien" Test, weil er nicht auf die Ausgangswerte zurückgreift, sondern auf die Rangreihe der Beobachtung.

2. Berechnung einseitiger Testwerte

2.1. Testergebnis der Mamma-Tumore (Pat. L. und S.)

Signifikanzschranke: $t_{(\alpha = 0,05;\ \beta = 0,0;\ f = \infty;\ K=5)} = 2,23$

Kontrolle gegen	t_k	Testentscheidung
Cyclophosphamid	-0,878	H_o
Amethopterin	-1,420	H_o
Oestrogen	-1,162	H_o
Adriamycin	-1,033	H_o
Teststeron	-2,711	H_o

Zusammenfassung:

Von allen Behandlungen scheint keine den c-AMP-Gehalt zu vermindern.

2.2. Testergebnisse des Ovarial-Tumors

Signifikanzschranke: $t_{(\alpha=0,05;\ \beta=0,5;\ f=\infty;\ K=3)} = 2,06$

Kontrolle gegen	t_k	Testentscheidung
Adriamycin	0,490	H_o
Amethopterin	1,567	H_o
Cyclophosphamid	1,859	H_o

Zusammenfassung:

Für den Ovarial-Tumor kann die Nullhypothese zwar für keine der Behandlungen abgelehnt werden, es besteht aber eine Tendenz,

daß unter den Behandlungen der c-AMP-Gehalt sich vermindert. Ob es sich dabei um Zufallsbefunde oder um reproduzierbare Ergebnisse handelt, sollte in weiteren Versuchen abgeklärt werden.
Aufgrund der hohen Streuung hinsichtlich der Herkunft des Tumorgewebes, die zumindest theoretisch vorausgesetzt werden muß, reicht aber auch eine deutlichere c-AMP-Verminderung oder -Erhöhung durch die Therapie noch nicht aus, um repräsentative Schlußfolgerungen für eine Grundgesamtheit von Mamma-bez. Ovarialtumoren zu ziehen.
Ein weiterer Punkt ist die Berücksichtigung der großen Streuung zwischen den Mäusen innerhalb der Versuchsgruppen. Schließlich ist der Unterschied im c-AMP-Spiegel zwischen der Kontrollgruppe und der Endoxangruppe so gering, daß dieses Ergebnis signifikant nur verifiziert werden kann, wenn unverhältnismäßig viele Versuchstiere zur Verfügung gestanden hätten.

V. Graphische Darstellung des Wachstums der Tumore

Im Anschluß an den experimentellen Teil der Arbeit wurde der Versuch gemacht, anhand einer graphischen Darstellung die Veränderung des Wachstums der Tumore - ausgedrückt in cm^2 - gegen die Zeit darzustellen. Die Tumoroberfläche ließ sich aus der Ellipsenformel berechnen, nachdem Länge und Breite ausgemessen wurde.
In dem beobachteten Zeitraum, der 3-18 Tage nach der Transplantation begann und über eine Zeit von 20 Tagen verlief, wurde der Tumor alle fünf Tage vermessen und das Ergebnis in eine Kurve eingetragen.

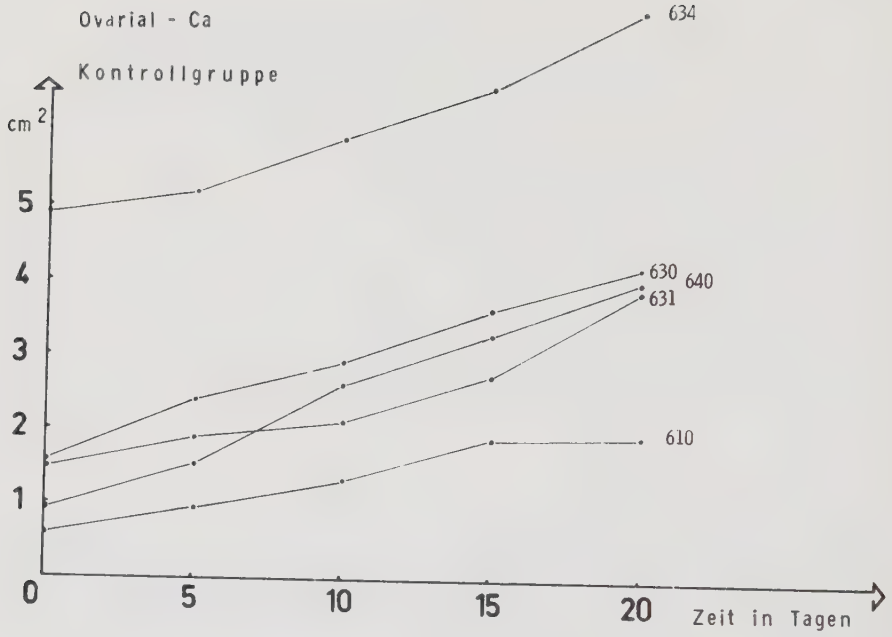


Abb. 1: Wachstumskurven des transplantierten Ovarial-Ca. Unbehandelte Kontrollgruppe.

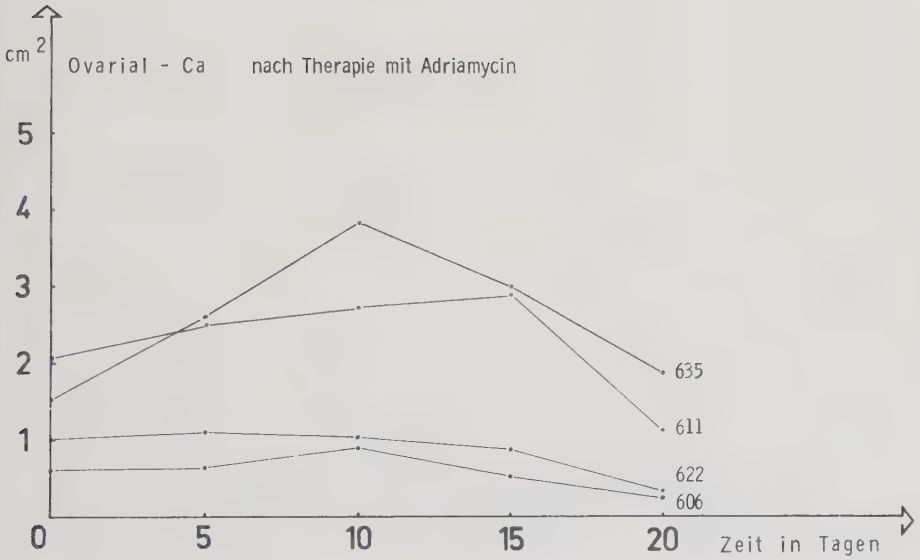


Abb. 2: Wachstumskurven des transplantierten Ovarial-Ca. Verlauf unter der Therapie mit Adriamycin.

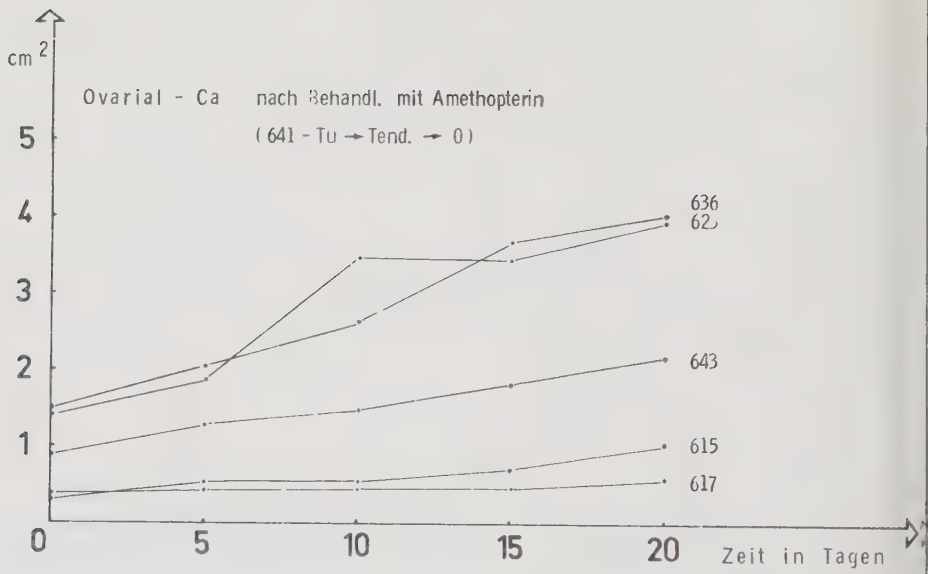


Abb. 3: Wachstumskurven des transplantierten Ovarial-Ca. Verlauf unter der Therapie mit Amethopterin.

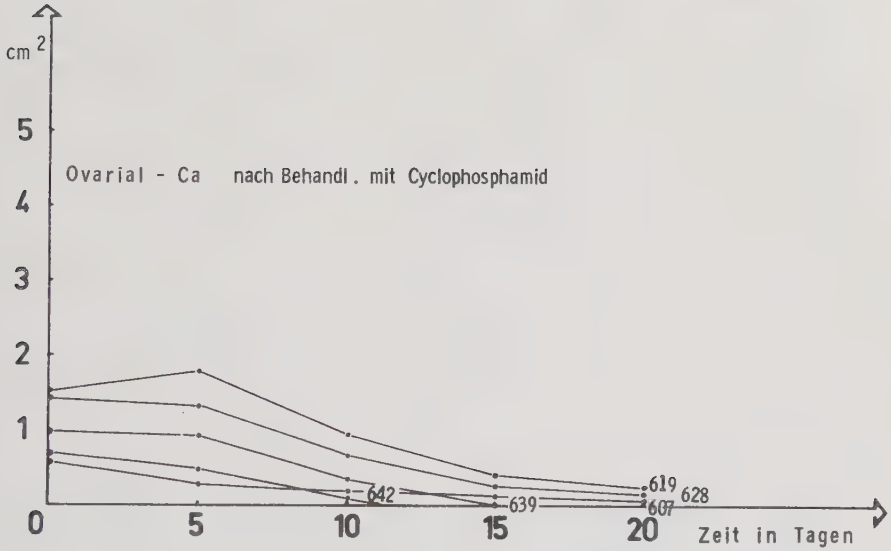


Abb. 4: Wachstumskurven des transplantierten Ovarial-Ca. Verlauf unter der Therapie mit Cyclophosphamid.

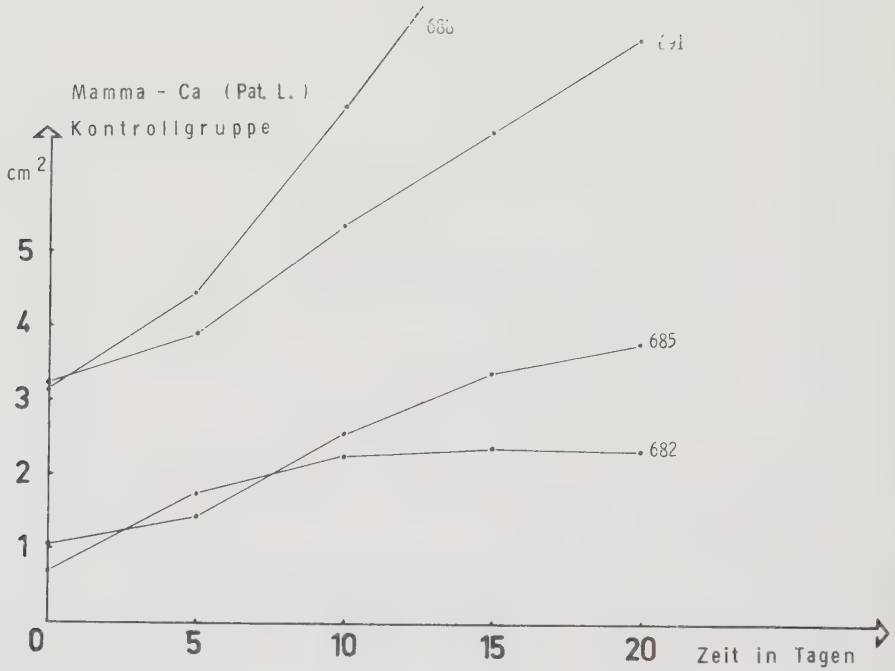


Abb. 5: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat. L.). Unbehandelte Kontrollgruppe.

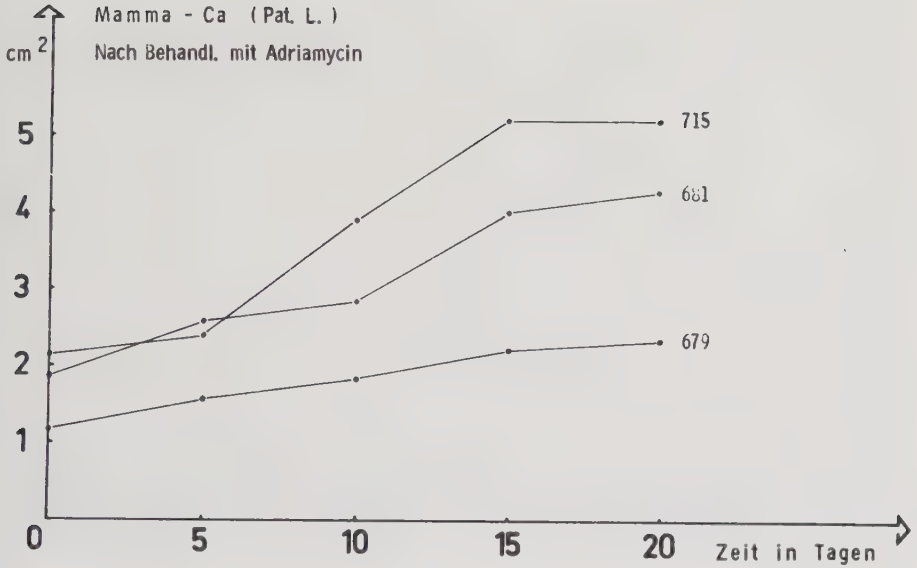


Abb. 6: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat. L.). Verlauf unter der Therapie mit Adriamycin.

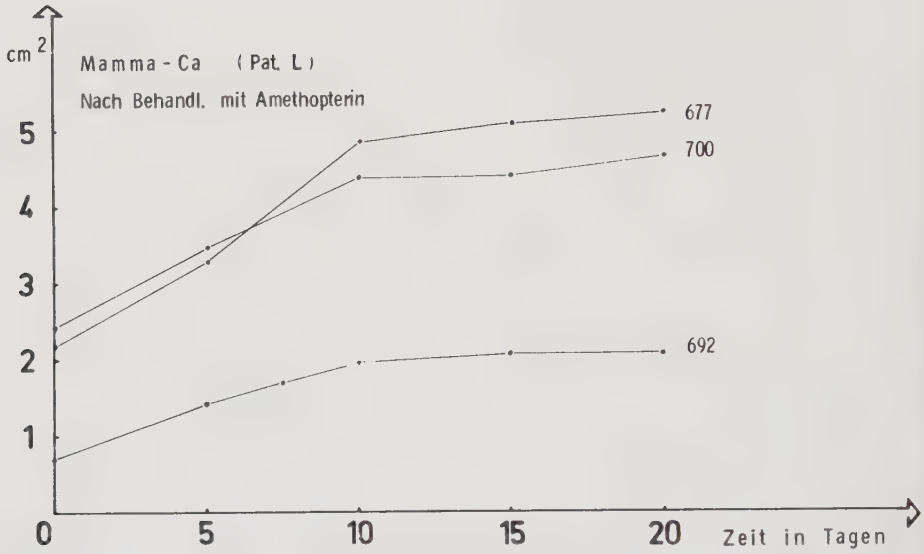


Abb. 7: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat. L.). Verlauf unter der Therapie mit Amethopterin.

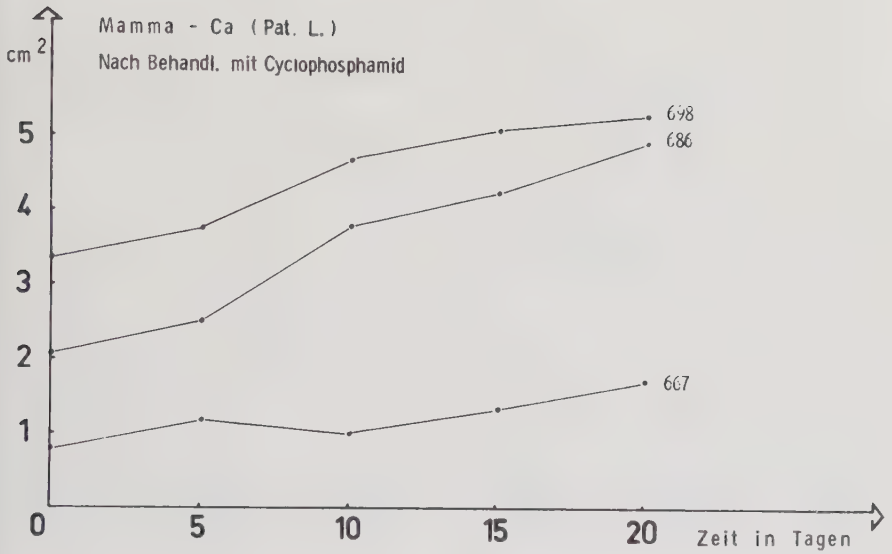


Abb. 8: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat. L.). Verlauf unter der Therapie mit Cyclophosphamid.

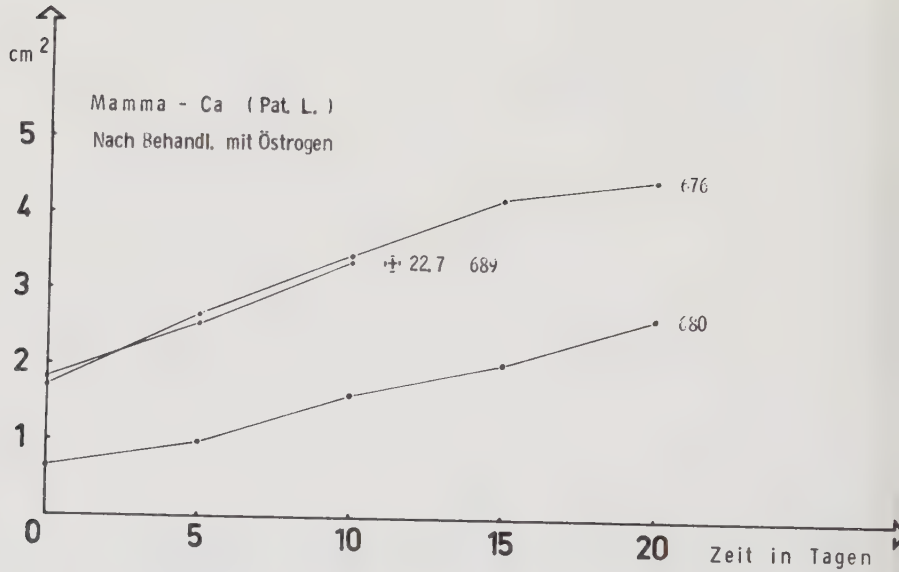


Abb. 9: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat. L.) Verlauf unter der Therapie mit Oestrogen.

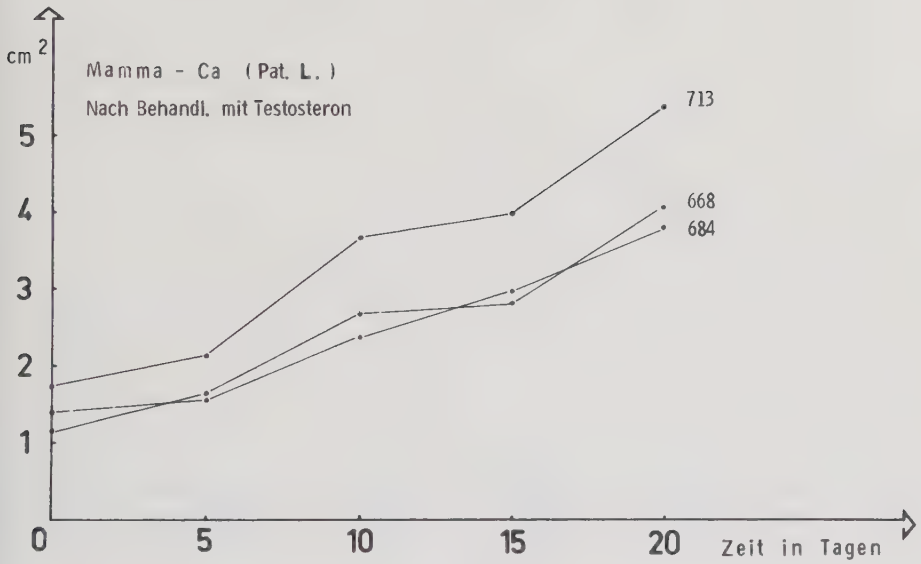


Abb. 10: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat. L.). Verlauf unter der Therapie mit Testosteron.

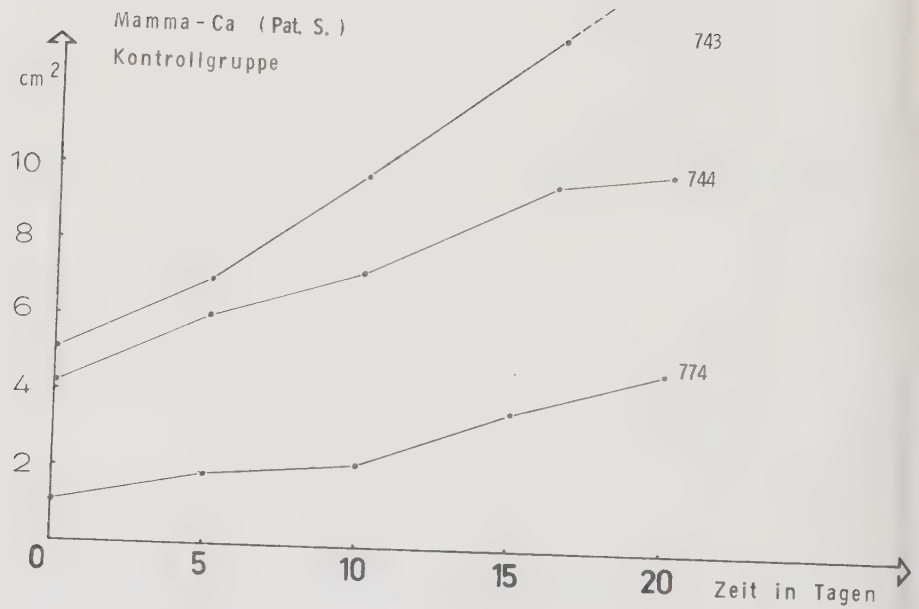


Abb. 11: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat.S.).. Unbehandelte Kontrollgruppe.

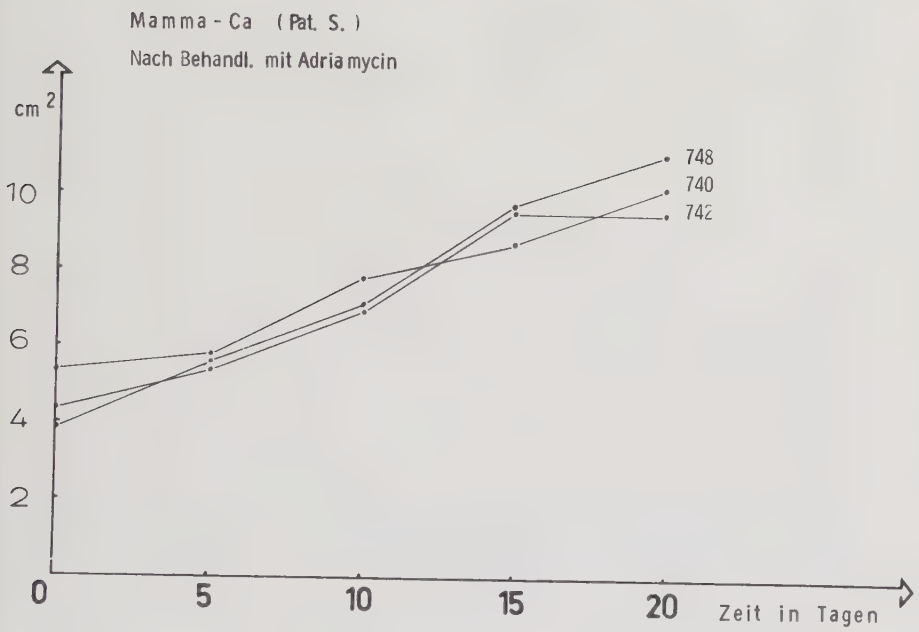


Abb. 12: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat.S.). Verlauf unter der Therapie mit Adriamycin.

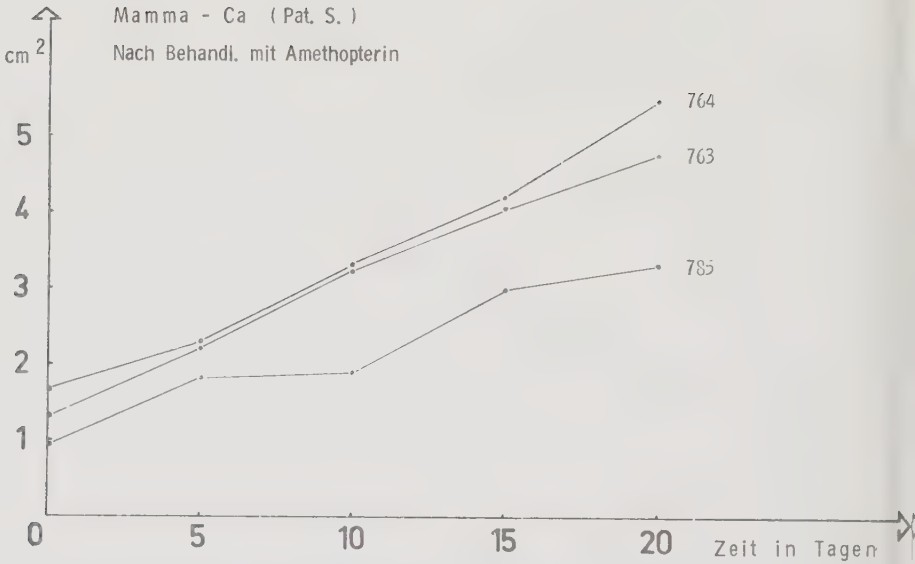


Abb. 13: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat.S.). Verlauf unter der Therapie mit Amethopterin.

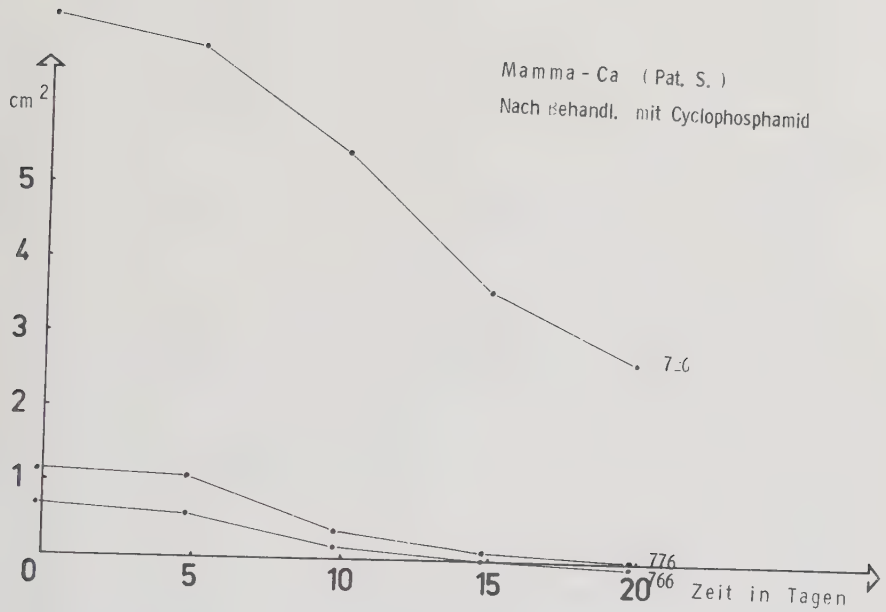


Abb. 14: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat.S.). Verlauf unter der Therapie mit Cyclophosphamid.

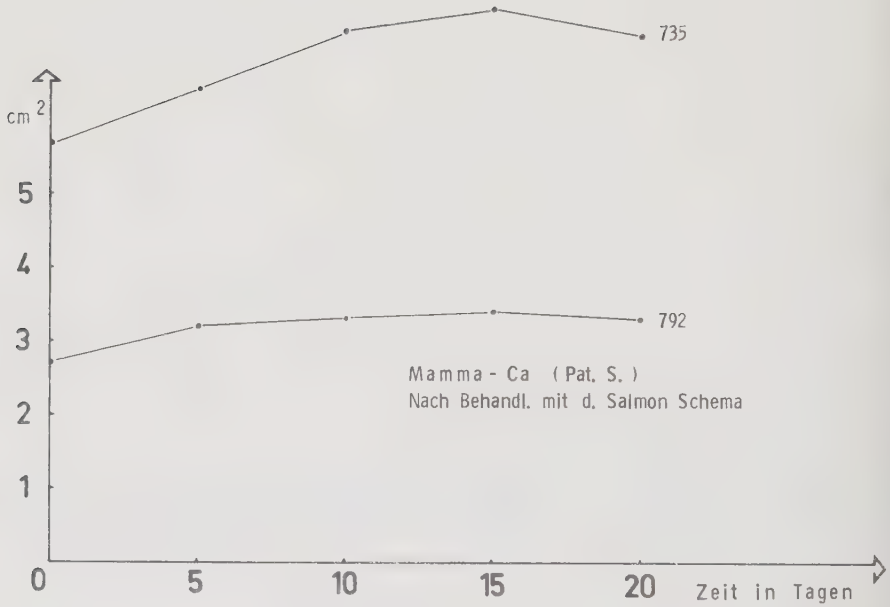


Abb. 15: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat.S.). Verlauf unter der Therapie mit dem Salmon-Schema.

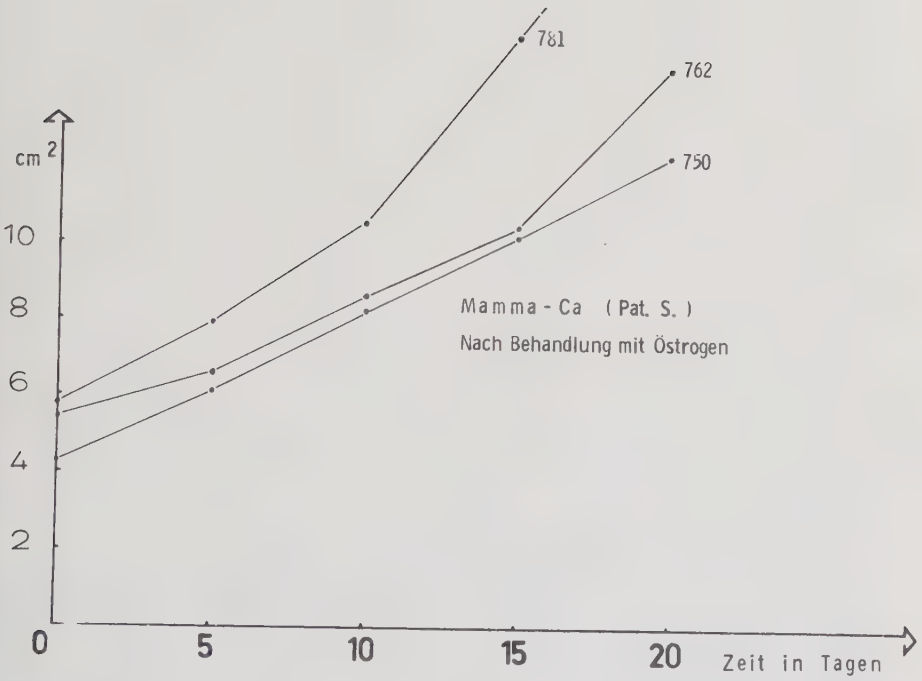


Abb. 16: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat.S.). Verlauf unter der Therapie mit Oestrogen.

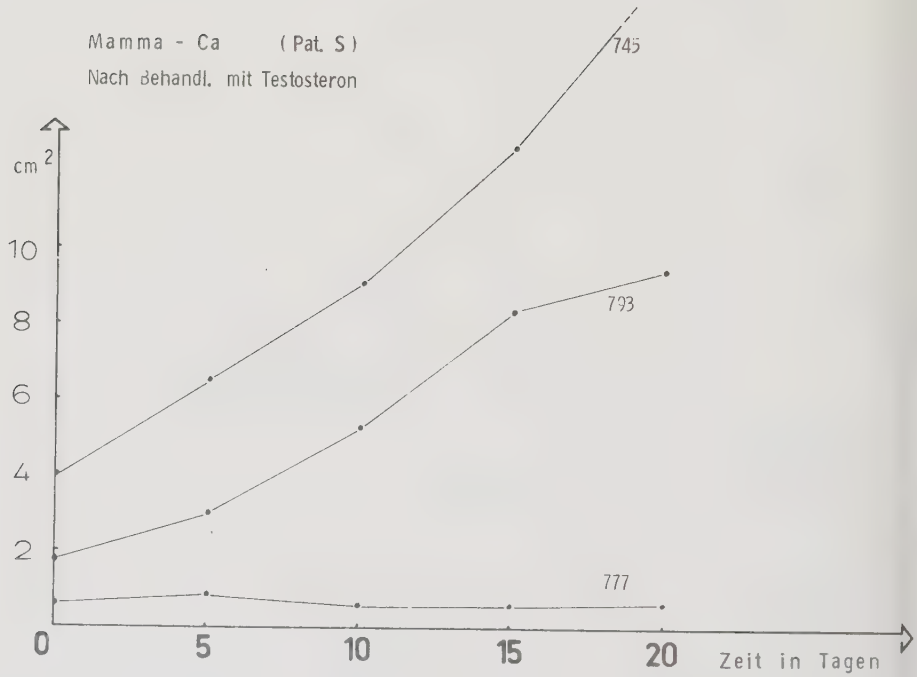


Abb. 17: Wachstumskurven des transplantierten Mamma-Ca (Pat.S.). Verlauf unter der Therapie mit Testosteron.

1.1. Ergebnisse der Wachstumskurven

Anhand der Wachstumskurve läßt sich bei allen durchgeführten Kontrollen (Tumore blieben ohne Therapie) ein sprunghaftes Ansteigen des Tumorwachstums - besonders im Zeitraum zwischen dem 10. und 15. Tag - erkennen (Abb.1,5,11).Dieser Anstieg ließ sich unabhängig von der transplantierten Tumorgröße nachweisen. Wurden die Tumor-tragenden Mäuse behandelt,so fiel bei dem getesteten Ovarial-Ca besonders unter der Cyclophosphamidtherapie die starke Regression auf (Abb. 4), während unter der Behandlung mit Amethopterin (Abb. 3) der Tumor, mit gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 1) verminderter Potenz, weiterwuchs. Zwischen diesen beiden Extremen liegt die Wachstumskurve des mit Adriamycin behandelten Tumors (Abb. 2).
Vergleicht man nun die Wachstumskurven der beiden Mammatumore: Bei ähnlich explosivem Wachstum der Kontrollgruppe (Abb. 5,11) läßt sich eine eindeutige und einschneidende Verminderung der Tumorgröße (Pat.S.) nur unter Therapie mit Cyclophosphamid (Abb. 14) und tendenziell dem Salmon-Schema erkennen (Abb. 15). Alle anderen Wachstumskurven dieser Patientin (Pat.S.) zeigten keine Tendenz gegen 0 (Abb. 12, 13, 16, 17). Die Wachstumsgeschwindigkeit der mit Oestrogen und Testosteron behandelten Tumore beider Patientinnen (Abb. 9, 10, 16, 17) ist sogar ähnlich der Kontrollgruppen (Abb. 5, 11).
Eine eindeutige Aussage zugunsten eines bestimmten Zytostatikums läßt sich für die getesteten Tumore der Pat. L. aus den Wachstumskurven nicht feststellen:
Hier war bei allen durchgeführten Therapien ein Anstieg der Wachstumskurven - mit verkleinertem Anstiegswinkel - zu verzeichnen (Abb. 6, 7, 8, 9, 10).

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem "in vivo"-Verfahren der c-AMP-Gehalt von transplantierten Mamma- und Ovarialcarcinomen unter antineoplastischer Therapie bestimmt. Als Transplantatempfänger wurden nu/nu Mäuse verwendet: Trotz erheblicher Schwankungen der Einzelwerte kann aus den Untersuchungsergebnissen gefolgert werden, daß der c-AMP-Gehalt in den hier transplantierten Mamma-Ca weder durch Adriamycin, Amethopterin,

Cyclophosphamid und Salmon-Schema noch durch Oestrogene und Testosteron signifikant verändert wird.
Dagegen ist für das transplantierte Ovarial-Carcinom nach den vorliegenden Ergebnissen eine leichte Verminderung der c-AMP-Spiegel unter der antineoplastischen Therapie zu vermuten.
Gleichzeitig kann aus der Arbeit entnommen werden, daß die c-AMP-Spiegel sowohl in normalem als auch in antineoplastisch behandeltem Tumorgewebe offenbar starken Schwankungen unterliegen, deren Ursachen im Einzelnen noch nicht völlig geklärt sind.
Ein signifikanter Zusammenhang des c-AMP-Gehaltes mit der Wachstumskurve der Tumore unter antineoplastischer Therapie konnte weder für die untersuchten Mamma-Carcinome noch für das Ovarial-Carcinom nachgewiesen werden.

VII. Diskussion

Grundlage der vorliegenden Arbeit war die Arbeitshypothese, daß Zytostatika und Steroidhormone in Abhängigkeit von ihrer antiproliferativen Wirkung eine Veränderung des c-AMP-Gehaltes im Tumorgewebe bewirken. Um möglichst vergleichbare Verhältnisse mit den natürlichen Wachstumsbedingungen der Tumore zu gewährleisten, wurde ein "in vivo"-Verfahren mit auf nu/nu Mäuse transplantierten Ovarial- und Mamma-Ca verwendet.
Als besondere Schwierigkeit erwies sich die Tatsache, daß die c-AMP-Spiegel schon in unbehandeltem Tumorgewebe relativ starken Schwankungen unterliegen. Minton et al.(32) fanden im Tumorgewebe der weiblichen Brust Schwankungen der c-AMP-Werte zwischen 0,85 und 5,75 pmol/mg Gewebe.
Duncan et al.(18) wiesen nach, daß bei Transplantation von Carcinomgewebe der weiblichen Brust auf männliche nu/nu Mäuse, der c-AMP-Gehalt etwa doppelt so hoch liegt wie bei den auf weibliche Mäuse transplantierten Tumoren.
Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten deutet darauf hin, daß unter der Einwirkung von Amethopterin, Adriamycin, Cyclophosphamid, Salmon-Schema und Steroidhormonen keine wesentliche Veränderung der c-AMP-Spiegel im Tumorgewebe eintritt.

Auch wenn die am Ovarialtumorgewebe gewonnenen Daten einen leicht verminderten c-AMP-Gehalt unter antineoplastischer Therapie vermuten lassen, können daraus noch keine wesentlichen Folgerungen gezogen werden. Die endgültige Zuordnung dieser Ergebnisse muß vorerst noch weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Einige Untersuchungen zeigen, daß erhöhte c-AMP-Spiegel - z.B. durch eine exogene Zufuhr - in Zellkulturen das Zellwachstum hemmen können (19,38,45).

In Übereinstimmung damit wurde bei schnell proliferierenden Tumorzellkulturen niedrige c-AMP-Spiegel und in nicht proliferierenden Tumorzellkulturen hohe c-AMP-Spiegel nachgewiesen (40). Bei einer Untersuchung unter "in vivo" Bedingung eines Lymphosarkoms der Maus konnte durch intratumorale Injektion von c-AMP ein Stillstand im Wachstum erzielt werden (19). Dieser Hemmeffekt war dosisabhängig und hielt nur über die Dauer der Behandlung an. Auch durch dib-c-AMP konnte beim Mamma-Carcinom der Maus ein Wachstumsstillstand erreicht werden, der sich durch Kastration aufheben ließ. Diese Ergebnisse konnten bei Versuchen an anderen Tumorgeweben nur teilweise reproduziert werden (14).

Trotz der sehr unterschiedlichen Untersuchungsmethoden, die einen Vergleich stark erschweren, fanden die meisten Untersucher bei "in vivo" Bedingungen an proliferierenden Tumorgewebe wesentlich höhere c-AMP-Spiegel als bei Untersuchungen unter "in vitro" Bedingungen. Auch dieser Befund steht in gewissem Widerspruch zu der, bei "in vitro" Untersuchungen gewonnenen Hypothese, daß hohe c-AMP-Spiegel das Tumorwachstum hemmen.

Manche Untersucher fanden in proliferierenden Tumorgewebe sogar höhere Spiegel als in normalem Gewebe.

Minton et al.(7) fanden in normalem Gewebe der weiblichen Brust c-AMP-Werte zwischen o,13 und 0,32 pmol/mg Gewebe, in dem entsprechenden Tumorgewebe jedoch Spiegel zwischen 0,85 und 5,75 pmol/mg Gewebe. Andere Untersuchungen weisen in ähnliche Richtung (12,53).

Auch für die in dieser Arbeit unter "in vivo" Bedingungen untersuchten Mamma- und Ovarialcarcinome konnte der beschriebene antiproliferative Effekt des c-AMP nicht nachgewiesen werden:

Die c-AMP-Spiegel der prolifierenden Tumorzellen zeigten keine Abweichung von den c-AMP-Spiegeln der in Rückbildung begriffenen antineoplastisch behandelten Tumore. Dies ließ sich auch aus den Wachstumskurven nachweisen.
Damit steht diese Untersuchung in Übereinstimmung mit anderen "in vivo" Versuchen, die ebenfalls keine Korrelation zwischen der c-AMP Akkumulation in der Zelle und dem Tumorwachstum gefunden haben (11, 26, 45).
Möglicherweise ist die Wirkung des c-AMP auf das Tumorwachstum weniger auf absolute intrazelluläre c-AMP-Gehalte zurückzuführen, als vielmehr auf die Induktion neuer Rezeptoren durch c-AMP (52, 53). Das Auftreten von Rezeptorproteinen in großen Mengen kann auf neoplastische Zellen hinweisen (8).
Parallel zu erhöhten c-AMP-Spiegeln im Tumorgewebe konnten auch höhere Adenylcyclasewerte ermittelt werden, wobei sich Hinweise auf das Vorhandensein zweier verschiedener Adenylcyclasen ergaben (54). Neben Veränderungen in der Aktivität der Adenylcyclase können auch Veränderungen der Aktivität der Phosphodieesterase den c-AMP-Spiegel beeinflussen (15).
Ein weiterer Aspekt ist die Wirkung des c-AMP auf degenerative Veränderungen: dib-c-AMP bewirkt sowohl bei "in vitro" Versuchen (60) als auch bei "in vivo" Versuchen (37) eine Verstärkung der Endocytose und Autophagozytose. Weiterhin fand sich eine Permeabilitätszunahme der lyosomalen Membran (25). Daraus leitete Hershko (23) die Hypothese ab, daß der erhöhte c-AMP-Spiegel in der Lage ist, eine Verminderung der Makromolekularsynthese und eine Vermehrung des Proteinabbaus zu bewirken.
Ferner läßt sich ein Einfluß auf das Immunsystem nachweisen: Neben der Tumorhemmung nach einer c-AMP Behandlung sowohl bei "in vivo" Versuchen als auch bei Versuchen in Zellkulturen (Lymphocyten) konnte eine Wirkung auf die zelluläre Immunantwort nachgewiesen werden (19, 41).
Die Kombination von c-AMP und poly A:U, die den c-AMP-Spiegel in der Zelle anheben soll, zeigt außer dem Hemmeffekt auf das Tumorwachstum auch eine Stimulation der Immunantwort (20, 40, 41). Darauf weisen auch Untersuchungen hin, die feststellen, daß eine Behandlung mit c-AMP vor einer Tumortransplantation hinsichtlich der Tumorhemmung, genau so effektiv ist, wie die

Behandlung des Wirtsorganismus nach der Transplantation (20, 40). Als notwendige Voraussetzung für die Immunstimulation nahmen Braun und Schiozowa (7) in ihren "in vitro" Untersuchungen zum Verhalten der Lymphozyten den Zell-zu-Zell-Kontakt an. Hier scheinen poly A:U und c-AMP auf direktem Weg auf die B-Lymphozyten einzuwirken und über die B-Lymphozyten die Bildung der T-Lymphozyten zu stimulieren.
Der Aspekt der immunologischen Beeinflussung entfällt natürlich bei "in vitro" Versuchen.
Seit 1970 ist man in der Lage, unter "in vivo" Bedingungen Kurzzeittestungen von Tumoren gegenüber verschiedenen Zytostatika durchzuführen (55, 56, 57, 58) und in die Tumortherapie miteinzubeziehen (4, 5, 6).
Trotz gewisser Erfolge lassen sich jedoch "in vitro" Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf die "in vivo" Verhältnisse übertragen (5, 6, 16, 29).
Hier zeigen die Untersuchungen von Rygaard und Povlsen (34, 42) einen neuen Weg in der Testung, indem sie menschliche Tumore auf thymusaplastische nu/nu Mäuse transplantierten, die ein Fehlen von T-Lymphozyten und damit eine mangelhafte zelluläre Immunantwort aufweisen (21, 24).
Die verschiedenen Zytostatika, mit denen die Mäuse behandelt wurden, unterliegen zwar einer dem menschlichen Organismus vergleichbaren Metabolisierung (17), dagegen lassen sich die gleichen immunologischen Beziehungen zwischen Transplantat und Tumorträger für nu/nu Mäuse nicht nachvollziehen.
Obwohl dieser Effekt auf das Immunsystem für die klinische Therapie wahrscheinlich keine wesentliche Bedeutung hat (3), muß er möglicherweise berücksichtigt werden, wenn Aussagen über das Verhältnis zwischen c-AMP, Tumor und Tumorträger gemacht werden sollen. Eine weitere Schwierigkeit bei der c-AMP Bestimmung in Tumoren besteht darin, daß das verwendete Tumorgewebe keine homogene Struktur aufweist. Im Allgemeinen besitzt jeder Tumor eine gut durchblutete äußere Zone und eine innere Zone mit Nekrosepartikeln. Daneben finden sich in unterschiedlicher Zahl und Verteilung Fettzellen, die nach der Literatur besonders hohe c-AMP-Gehalte aufweisen sollen (2).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die c-AMP Bestimmungen in transplantierten Tumoren nach der hier verwendeten Methode offenbar noch keine sicheren Aussagen über das Tumorwachstum und seine Beeinflußbarkeit mit antineoplastischen Substanzen erlaubt.

VIII. Literaturverzeichnis

1. D'Armiento M., Johnson G.S., Pastan I. 1972
Regulation of Adenosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase Activity in Fibroblasts by Intracellular Concentrations of Cyclic Adenosine Monophosphate.
Proceedings of the National Academy of Sciences 69: 459

2. Arner P., Ostman J. 1978
Relationship between the Tissue Level of Cyclic AMP and the Fat Cell Size of Human Adipose Tissue.
Journal of Lipid Research 19: 613

3. Bastert G., Fortmeyer H.P., Eichholy H., Michel R.-Th, Huck R. und Schmidt-Matthiesen H.: Human Breast Cancer in Thymusaplastic Nude Mice. In: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
(eds.) Bastert, Fortmeyer, Schmidt-Matthiesen, Gustav Fischer Verlag Stuttgart-New York 1981 pp. 157

Bastert, G., Eichholz H., Michel R.-Th., Fortmeyer H.P., Huck R. und Schmidt-Matthiesen H.: Testing of Cytostatic Drugs and X-Ray Radiation in Xenotransplanted Human Ovarian Carcinomas. In: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
(eds.) Bastert, Fortmeyer, Schmidt-Matthiesen, Gustav Fischer Verlag Stuttgart-New York 1981 pp. 125

Michel, R.-Th., Bastert G., Fortmeyer H.P., Eichholz H. und Schmidt-Matthiesen H.: Hormonal and Combined Hormonal-Cytostatic Hormonal-Cytostatic Drug Therapy of Human Mammary Carcinomas after Xenotransplantation into nu/nu Mice. In: Thymusaplastic Nude Mice and Rats in Clinical Oncology.
(eds.) Bastert, Fortmeyer, Schmidt-Matthiesen. Gustav Fischer Verlag Stuttgart-New York 1981, pp. 183

4. Bastert G., Schmidt-Matthiesen H., Gerner R., Michel R.T., Nord D., Leppien G. 1975
In vitro Testung der Sensibilität von Mammakarzinomen gegen Zytostatika.
Dtsch. med. Wsch. 100: 2035

5. Bastert G., Schmidt-Matthiesen H., Voelcker G., Peter G., Hohorst H.J. 1975
In vitro Sensibilisierung von Tumoren gegenüber aktiviertem Cyclophosphamid (4-Hydrocyclophosphamid). Kurzzeitinkubation von Originaltumorzellen und 3H-Uridin- bzw. 3H-Thymidin einbau.
Z. Krebsforschung 84: 37

6. Bastert, G., Voelker G., Peter G., Schmidt-Matthiesen H., Hohorst H.J. 1976
Zum Problem der in vitro Sensibilitätstestung von Tumoren gegen Cyclophosphamid. 3H-Uridineinbau in RNS menschlicher Tumorzellen nach Inkubation mit 4-Hydroxycyclophosphamid.
Z. Krebsforschung 85: 299

7. Braun W.,Schizowa C. 1974
Immunenhancing and Antitumor Effects of Agents that Elevate Endogenous C-AMP Levels.
In: Investigation and Stimulation of Immunity in Cancer Patients.
Eds.: Mathe G., Weiner R., Springer Verlag New York : 338

8. Brennan M.J. 1975
Endocrinology in Cancer of the Breast -Status and Prospects.
Am. J. Clin. Path. 64: 797

9. Burger M.M., Bombik B.M., Breckenridge B.M., Sheppard J.R. 197
Growth Control and Cyclic Alterations of C-AMP in the Cell Cycle.
Nature - New Biology 239: 161

1o. Burger M., Knyszynski A. 1971
The Effect of Adenosine-3',5'-Monophosphate on (^{3}H)Thymidine Incorporation in Vitro into Mouse Spleen and Thymic Cells.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 352: 1o19

11. Butcher F.R., Scott D.F., Potter V.R., Morris H.P. 1972
Endocrine Control of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels in Several Morris Hepatomas.
Cancer Res. 32: 2135

12. Chayoth R., Epstein S., Field J. B. 1972
Increased Cyclic AMP Levels in Malignant Hepatic Nodules of Ethioneine Treated Rats.
Biochem. and Biophys. Res. Comm. 49: 1663

13. Cheung W. 1969
Cyclic 3', 5'-Nucleotide Phosphodiesterase.
In: Role of Cyclic AMP in Cell Function, Advances in Biochem. Psychopharmak., Vol. 3
Eds.: Greengard P., Costa E. Raven Press, New York

14. Cho-Chung Y. S. 1974
In Vivo Inhibition of Tumor Growth by Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate Derivates.
Cancer Res. 34: 3492

15. Clark J. F., Morris H. P., Weber G. 1973
Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate Phosphodiesterase Activity in Normal, Differentiating, Regenerating, and Neoplastic Liver.
Cancer Res. 33: 356

16. Cobb J. P.1955
Tissue Culture Observation of Effects of Chemotherapeutic Agents of Human Tumors.
Transact. N.Y. Acad. Sci. 17: 237

17. Dost F.H. 1968
Grundlagen der Pharmakokinetik. II. Auflage 1968
Thieme Verlag Stuttgart

18. Duncan K.L., Singer A.L., Joyce J.A., Puffer H.W. et Warner N.E. 1978
Cyclic Nucleotide Levels in a Human Breast Carcinoma Transplanted into Athymic Nude Mice.
Proc. West Pharmacol. Soc. 21: 4o1

19. Gericke D., Chandra P. 1969
Inhibition of Tumor Growth by Nucleoside Cyclic 3',5'-Monophosphates.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Phys. Chem. 35o: 1469

2o. Gericke D., Chandra P., Wacker A. 197o
Some Effects of Adenosine 3',5'-Monophosphate and Double Stranded RNA, Poly I:C, on Friend Leukemia in Mice.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Phys. Chem. 351: 411

21. Gisler R.H., Schumann P., Dukor P. 1974
Functional Characteristics of Lymphozyte Populations from Nude Mice: Requirements for Antibodyformation in Vitro.
In: Proceedings of the first International Workshop on Nude Mice.
Eds.: Rygaard J., Povlsen C.O.. G. Fischer Verlag, Stuttgart.

22. Hackenberg U., Bartling H. 1969
Messen und Rechnen im pharmakologischen Laboratiorium mit einem speziellen Zahlensystem (WL 24-System).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmac. 235: 437

23. Hershko A., Marmont P., Shields R., Tomkins G.M. 1971
Pleiotypic Response.
Nature New Biology 232: 2o6

24. Holub M., Hajdu I., Trebichavsky P., Rossmann P. 1974
Lack of Plasma Cell Differentiation in the Athymic Nude Mice.
In: Proc. of the First Intern. Workshop on Nude Mice.
Eds.: Rygaard J., Povlsen C.O. G. Fischer Verlag Stuttgart

25. Imre S. 1972
3',5'-C-AMP and Lyosome Membrane Labilization.
Experientia 28: 513

26. Johnson G.S., Pastan I. 1972
Role of 3',5'-Adenosine Monophosphate in Regulation of Morphology and Growth of Transformed and Normal Fibroblasts.
J. Nat. Cancer Inst. 48: 1377

27. Kaukel E., Fuhrmann U., Hilz H. 1972
Permeation of Dibutyryl cAMP into HeLa Cells and its Conversion to Monobutyryl cAMP.
Biochemical and Biophysical Research Communications 46: 1011

28. Kreider J.W., Rosenthal M., Lengle N. 1973
Cyclic Adenosine-3', 5'-Monophosphate in the Control of Melanoma Cell Replication and Differentiation.
Journal of the National Cancer Institute 50: 555

29. Limburg H., Krahe M. 1964
Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und deren Austestung gegenüber neueren Zytostatika.
Arch. Gynäk. 202: 59

30. Makman M.H., Klein M.I. 1972
Expressions of Adenylate Cyclase, Catecholamine Receptor, and Cyclic AMP Dependent Protein Kinase in Synchronized Culture of Chang's Liver Cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences 69: 456

31. Millis A.J.T., Forrest G., Pious D.A. 1973
Cyclic AMP and Mitosis in Synchronized Human Lymphoid Cells.
Federation Proceedings 32: 609

32. Minton J.P., Wisenbaugh T., Mattews R.H. 1974
Elevated Cyclic AMP Levels in Human Breast-Cancer Tissue.
Journal of the Nat. Cancer Inst. 53: 283

33. Morley A., Quesenberry P., Garrity M., St-ohlman F.Jr. 1971
Inhibition of Marrow Growth by Cyclic AMP.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 138: 57

34. Povlsen C.O., Rygaard J. 1971
Heterotransplantation of Human Adenocarcinomas of the Colon and Rectum to the Mouse Mutant Nude.
A Study of Nine Consecutive Transplantations.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. a 79: 159

35. Rall T.W., Sutherland E.W. 1958
Formation of Cyclic Adenosine Nucleotide by Tissue Particles.
Journal of Biolog. Chem. 232: 1065

36. Rall T.W., Sutherland E.W. 1962
Adenyl Cyclase. II The Enzymatic Catalyzed Formation of Adenosine 3',5'-Phosphate and Inorganic Pyrophosphate from Adenosine Triphosphate.
The Journal of Biolog. Chem. 237: 1228

37. Rosa G. 1971
Ultrastructural Changes Produced by Glucagon, Cyclic 3',5'-AMP and Epinephrine on Perfused Rat Livers.
J. Ultrastruc. Res. 34: 205

38. Ryan W.L., Heidrick L.M. 1968
Inhibition of Cell Growth in Vitro by Adenosine-3',5'-Monophosphate.
Science 162: 1485

39. Ryan W.L., Heidrick L.M. 1974
Roles of Cyclic Nucleotides in Cancer.
Advanc. in Cyclic Nucl. Res. 4: 86

40. Ryan W.L., McClurg J.E. 1974
Tissue Levels of Cyclic AMP and Tumor Inhibition.
In: Cyclic AMP, Cell Growth, and the Immune Response
Eds.: Braun W., Lichtenstein L.M., Parker Ch.W.
Springer Verlag New York : 329

41. Rigby P.G., McCurdy F., McCrery J. 1974
The Effect of Cyclic AMP and Related Agents on Survival of Tumor-Challenged Animals.
In: Cyclic AMP, Cell Growth, and the Immune Response
Eds.: Braun W.,Lichtenstein L.M., Parker Ch.W.
Springer Verlag New York : 377

42. Rygaard J., Povlsen C. O. 1969
Heterotransplantation of a Human Malignant Tumor to "Nude" Mice.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A 7: 758

43. Schröder J., Plagemann P.G.W. 1972
Cyclic 3',5'-Nucleotide Phosphodiesterase of Novikoff Rat Hepatoma, Mouse L and HeLa Cells growing in Suspension Culctures.
Cancer Res. 32: 1o82

44. Sheppard J.R. 1971
Restauration of Contact-Inhibited Growth to Transformed Cells by Dibutyryl Adensosine-3',5'-Cyclic Monophosphate.
Proceedings of the National Academy of Sciences 68: 1316

45. Sheppard J.R. 1972
Differene in the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels in Normal and Transformed Cells.
Nature New Biology 236: 14

46. Sheppard J.R. 1974
The Role of Cyclic AMP in the Control of Cell Division.
In: Cyclic AMP, Cell Growth, and the Immune Response
Eds.: Braun W., Lichtenstein L.M., Parker Ch.W.
Springer Verlag New York: 29o

47. Sheppard J.R., Prasad K.N. 1973
Cyclic AMP Levels and the Morphological Differentiation of Mouse Neuroblastoma Cells.
Life Sciences 12: 431

48. Stoker M.G.P., Rubin H. 1967
Microbiology. Density Dependent Inhibition of Cell Growth in Culture.
Nature 215: 171

49. Sutherland, E.W., Rall T.W. 1957
The Properties of an Adenine Ribonucleotide Produced with Cellular Particles, ATP, Mg^{++}, and Epinephrine or Glucagon.
Journal of Analytical Chem. Society 79: 3608

50. Sutherland E.W., Rall T.W. 1958
Fractionation and Characterisation of a Cyclic Adenine Ribonucleotide Formed by Tissue Particles.
Journal of Biological Chemistry 232: 1077

51. Sutherland E.W., Robison G.A., Butcher R.W. 1968
Some Aspects of the Biological Role of Adenosine-3', 5' - Monophosphate (Cyclic AMP).
Circulation 37: 279

52. Teel R.W., Hall R.G. 1973
Effect of Dibutyryl Cyclic AMP on the Restoration of Contact Inhibiting in Tumor Cells and Its Relationship to Cell Density and the Cell Cycle.
Experimental Cell Research 76: 390

53. Thomas E.W., Murad F., Looney W.B., Morris H.P. 1973
Adenosine 3', 5'-Monophosphate and Guanosine 3',5' - Monophosphate: Concentrations in Morris Hepatomas of Different Growth Rates.
Biochem. et Biophys. Acta 297: 564

54. Tomasi V., Rethy A., Trevisani A. 1973
Soluble and Membrane Bound Adenylate Cyclase Activity in Yoshida Ascites Hepatoma.
Life Sciences 12: 145

55. Volm M., Bastert G., Mattern J., Wayss K. 1973
Onkobiogramm und Therapieerfolg bei Transplantations-tumoren.
Naturwissenschaften 60: 395

56. Volm M., Mattern J. 1976
Individuelle Chemotherapie solider Tumore.
Med. Welt 27: 1171

57. Volm M., Kaufmann K., Hinderer H., Goerttler K. 1970
Schnellmethode zur Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegenüber Cyt-ostatika.
Klin. Wochensch. 48: 374

58. Volm M., Kaufmann K., Wayss K., Goerttler K., Mattern J. 1974
Gezielte Tumor-Chemotherapie durch Onkobiogramme.
Deutsche med. Wochensch. 99: 38

59. Van Wijk R., Wicks W.D., Clay K. 1972
Effects of Derivatives of Cyclic 3', 5'-Adenosine Monophosphate on the Growth Morphology and Gene Expression of Hepatoma Cells in Culture.
Cancer Research 32: 1905

60. Yang T.J., Wang N.S. 1974
Dibutyryl Cyclic AMP: Increase in Viral Particles Associated with Morphologic Changes in Leukemic Cells.
Expl. Mol. Path. 20: 147

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"Experimentelle Untersuchungen zur Veränderung des c-AMP Spiegels in antineoplastisch behandelten menschlichen Tumoren nach Heterotransplantation auf nu/nu Mäuse"

im Zentrum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Abteilung für Gynäkologie und Onkologie, unter Leitung von Herrn Professor Dr. Gunther Bastert, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich Humanmedizin ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, den 9.9.1983

Corina Schuh-Krippel

Christa Seibel-Kreppel

Günthersburgallee 21
6ooo Frankfurt 1

Lebenslauf

Am 3. September 1947 wurde ich als Tochter des Malermeisters August Seibel und seiner Ehefrau Margarete Seibel, geb. Hinkel, in Kirberg/limburg geboren.
Nach vier Jahren Grundschule in Hadamar besuchte ich von 1957 - 1965 das Realgymnasium in Limburg/Lahn. Zwischen 1965 und 1967 wurde ich in Frankfurt zur Medizinisch Technischen Assistentin ausgebildet.
Während meiner Berufstätigkeit als MTA im St. Katharinen-krankenhaus und in den Universitätskliniken in Frankfurt bereitete ich mich auf die externe Abiturprüfung am Goethe-gymnasium in Neu Isenburg vor, die Reifeprüfung leistete ich 1972.
Von 1973 - 1979 studierte ich Humanmedizin in Frankfurt an der Johann Wolfgang GoetheUniversität.
Vom 1.7.1979 - 31.3.198o war ich Assistenzärztin in der Inneren Abteilung der Hohenfeldklinik in Camberg.
Im November 1979 heiratete ich.
Vom 1.7.198o - 8.7.1982 arbeitete ich im Diakonissenkranken-haus in Frankfurt, Innere Abteilung, unter der Leitung von Herrn Professor Huth.
Wegen der Geburt unseres Kindes im Januar 1982 habe ich meine Berufstätigkeit unterbrochen.

Frankfurt, den 9.9.1983

Christa Seibel-Kreppel